

# الهندسة الوراثية والوراثة الميكروبية

( الجزء الأول )

تأليف

أ.د. عماد الدين حسين وصفى

أستاذ ورئيس قسم النبات الزراعى وأمراض النبات

كلية الزراعة - جامعة الإسكندرية

حائز على جائزة جامعة الإسكندرية التشجيعية عام ١٩٧٧

حائز على جائزة جامعة الإسكندرية التقديرية عام ٢٠٠٥



الدار العربية للنشر والتوزيع





# **الهندسة الوراثية والوراثة الميكروبية**





# الهندسة الوراثية والوراثة الميكروبية

## الجزء الأول

تأليف

**أ. د. عماد الدين حسين وصفى**

أستاذ ورئيس قسم النبات الزراعى وأمراض النبات

كلية الزراعة – جامعة الإسكندرية

حائز على جائزة جامعة الإسكندرية التشجيعية عام ١٩٧٧

حائز على جائزة جامعة الإسكندرية التقديرية عام ٢٠٠٥

الطبعة الأولى

٢٠٠٧



**حقوق النشر**  
**الهندسة الوراثية**  
**والوراثة الميكروبية**

رقم الإيداع : ٢٥٠٦/٢٠٠٦  
I. S. B. N. : 977-258-290-2

حقوق النشر محفوظة  
لدار العربية للنشر والتوزيع  
٣٢ شارع عباس العقاد - مدينة نصر  
ت : ٢٧٥٣٣٣٥ فاكس : ٢٧٥٣٣٨٨

لا يجوز نشر أى جزء من هذا الكتاب، أو اختزان مادته بطريقة الاسترجاع أو نقله على أى وجه، أو بأى طريقة، سواء أكانت إلكترونية، أو ميكانيكية، أو بالتصوير، أو بالتسجيل، أو بخلاف ذلك إلا بموافقة الناشر على هذا كتابة، ومقدمًا.



## مقدمة الناشر

يتزايد الاهتمام باللغة العربية في بلادنا يوماً بعد يوم. ولا شك أنه في الغد القريب ستستعيد اللغة العربية هيبتها التي طالما امتهنت وأذلت من أبنائها وغير أبنائها. ولا ريب في أن امتهان لغة أية أمة من الأمم هو إذلال ثقافي فكري للأمة نفسها؛ الأمر الذي يتطلب تضافر جهود أبناء الأمة رجالاً ونساءً، طلاباً وطالبات، علماء ومثقفين، مفكرين وسياسيين في سبيل جعل لغة العروبة تحتل مكانتها اللائقة التي اعترف المجتمع الدولي بها لغة عمل في منظمة الأمم المتحدة ومؤسساتها في أنحاء العالم، لأنها لغة أمة ذات حضارة عريقة استوعبت - فيما مضى - علوم الأمم الأخرى، وصهرتها في بوتقتها اللغوية والفكرية، فكانت لغة العلوم والأدب، ولغة الفكر والكتابة والمخاطبة.

إن الفضل في التقدم العلمي الذي تنعم به أوروبا اليوم يرجع في واقع إلى الصحة العلمية في الترجمة التي عاشتها في القرون الوسطى. فقد كان المرجع الوحيد للعلوم الطبية والعلمية والاجتماعية هو الكتب المترجمة عن اللغة العربية لابن سينا وابن الهيثم والفارابي وابن خلدون وغيرهم من عمالقة العرب، ولم ينكر الأوروبيون ذلك، بل يسجل تاريخهم ما ترجموه عن حضارة الفراعنة والعرب والإغريق، وهذا يشهد بأن اللغة العربية كانت مطوعة للعلم والتدريس والتأليف، وأنها قادرة على التعبير عن متطلبات الحياة وما يستجد من علوم، وأن غيرها ليس بأدق منها، ولا أقدر على التعبير.

ولكن ما أصاب الأمة من مصائب وجمود بدأ مع عصر الاستعمار التركي، ثم البريطاني والفرنسي، عاق اللغة عن النمو والتطور، وأبعدها عن العلم والحضارة، ولكن عندما أحس العرب بأن حياتهم لا بد من أن تتغير، وأن جمودهم لا بد أن تدب فيه الحياة، اندفع الرواد من اللغويين والأدباء، والعلماء في إنماء اللغة وتطويرها، حتى أن مدرسة قصر العيني في القاهرة، والجامعة الأمريكية في بيروت درست الطب بالعربية أول إنشائها. ولو تصفحنا الكتب التي ألفت أو تُرجمت يوم كان الطب يدرس فيهما باللغة العربية لوجدناها كتباً ممتازة لا تقل جودة عن أمثلتها من كتب الغرب في ذلك الحين، سواء في الطب، أو حسن التعبير، أو براعة الإيضاح، ولكن هذين المعهدين تنكرا للغة العربية فيما بعد، وسادت لغة المستعمر. وفرضت على أبناء الأمة فرضاً، إذ رأى المستعمر في خنق اللغة العربية مجالاً لعرقلة الأمة العربية.

وبالرغم من المقاومة العنيفة التي قابلها، إلا أنه كان بين المواطنين صنائع سبقوا الأجانب فيما يتطلع إليه، فتفننوا في أساليب التملق له اكتساباً لرضاته، ورجال تأثروا بحملات المستعمر الظالمة، يشككون في قدرة اللغة على استيعاب الحضارة الجديدة، وغاب عنهم ما قاله الحاكم الفرنسي لجيشه الزاحف إلى الجزائر: "علموا لغتنا وانشروها حتى نحكم الجزائر، فإذا حكمت لغتنا الجزائر، فقد حكمناها حقيقة".



فهل لى أن أوجه نداءً إلى جميع حكومات الدول العربية بأن تبادر - فى أسرع وقت ممكن - إلى اتخاذ التدابير، والوسائل الكفيلة باستعمال اللغة العربية لغة تدريس فى جميع مراحل التعليم العام، والمهنى، والجامعى، مع العناية الكافية باللغات الأجنبية فى مختلف مراحل التعليم لتكون وسيلة الإطلاع على تطور العلم والثقافة والانفتاح على العالم. وكلنا ثقة من إيمان العلماء والأساتذة بالتعريب، نظراً لأن استعمال اللغة القومية فى التدريس ييسر على الطالب سرعة الفهم دون عائق لغوى، وبذلك تزداد حصيلته الدراسية، ويرتفع بمستواه العلمى، وذلك يعتبر تأصيلاً للفكر العلمى فى البلاد، وتمكيناً للغة القومية من الازدهار والقيام بدورها فى التعبير عن حاجات المجتمع، وألفاظ ومصطلحات الحضارة والعلوم.

ولا يغيب عن حكومتنا العربية أن حركة التعريب تسير متباطئة، أو تكاد تتوقف، بل تحارب أحياناً ممن يشغلون بعض الوظائف القيادية فى سلك التعليم والجامعات، ممن ترك الإستعمار فى نفوسهم عقداً وأمراضاً، رغم أنهم يعلمون أن جامعات إسرائيل قد ترجمت العلوم إلى اللغة العبرية، وعدد من يتخاطب بها فى العالم لا يزيد عن خمسة عشر مليون يهودياً، كما أنه من خلال زياراتى لبعض الدول واطلاعى وجدت كل أمة من الأمم تدرس بلغتها القومية مختلف فروع العلوم والآدب والتقنية، كاليابان، وإسبانيا، وألمانيا، ودول أمريكا اللاتينية، ولم تشك أمة من هذه الأمم فى قدرة لغتها على تغطية العلوم الحديثة، فهل أمة العرب أقل شأنًا من غيرها؟!.

وأخيراً .. وتمشياً مع أهداف الدار العربية للنشر والتوزيع، وتحقيقاً لأغراضها فى تدعيم الإنتاج العلمى، وتشجيع العلماء والباحثين فى إعادة مناهج التفكير العلمى وطرائقه إلى رحاب لغتنا الشريفة، تقوم الدار بنشر هذا الكتاب المميز الذى يعتبر واحداً من ضمن ما نشرته - وستقوم بنشره - الدار من الكتب العربية التى قام بتأليفها أو ترجمتها نخبة ممتازة من أساتذة الجامعات المصرية والعربية المختلفة.

وبهذا .. ننفذ عهداً قطعناه على الماضى قدما فيما أردناه من خدمة لغة الوحي، وفيما أرداه الله تعالى لنا من جهاد فيها.

وقد صدق الله العظيم حينما قال فى كتابه الكريم: ﴿وَقُلْ اَعْمَلُوا فَسَيَرَى اللّٰهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ وَسَتُرَدُّونَ اِلَىٰ عَالَمِ الْغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُمْ بِمَا كُنْتُمْ تَعْمَلُونَ﴾.

محمد أحمد درباله

الدار العربية للنشر والتوزيع



بسم الله الرحمن الرحيم

## إهداء

من أسرتي:

والدتي ووالدي وبناتي المهندستان مروه ومي وزوجتي

من أساتذتي:

إلى أستاذي المرحوم الأستاذ الدكتور إلى أستاذي المرحوم الأستاذ الدكتور

صلاح الدين عيد

عباس فتحي الهلال

رائد علم أمراض النبات في مصر أحد رواد ومؤسس علم النبات في مصر

وقد علمني الكثير من علمه وخلفه وقد علمني أيضًا الكثير من علمه وخلفه

وأساتذتي الأفاضل أطل الله في عمرهم الأستاذ الدكتور مصطفى أبو الذهب: أحد أعلام أمراض النبات وأحد مؤسسي علم أمراض النبات البكتيرية والفطرية.

الأستاذ الدكتور حسين العروسي: أحد أعلام أمراض النبات وأحد مؤسسي علم أمراض النبات الفطرية.

الأستاذ الدكتور وجدي السواح: أحد أعلام أمراض النبات وأحد مؤسسي علم أمراض النبات الفطرية.







## المقدمة

تعتبر الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية بمثابة الثورة العلمية الرابعة بعد الثورات العلمية المرتبطة باستخدام البخار ثم الطاقة النووية فثورة المعلومات (ومنها علوم الكمبيوتر) ... وحيث أن العالم العربية بما فيه مصر لم يشترك بالبحث مع الدول المتطورة. فى الثورات العلمية الثلاث الأولى فإنه لم يعد مسموحاً أن تفوته ثورة الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية ... ذلك أن الدول التى ستمتلك ناصية الثورة الرابعة خلال القرن القادم ستمتلك العالم ... إذ أن الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية ترتبط بشتى نواحي العلم سواء الزراعى أو الدوائى أو الطبى أو البيطرى أو الهندسى أو البيئى وبما يتحكم فى غذاء وكساء وعلاج الإنسان وغيره من المخلوقات .. يحتاج الإلمام بالهندسة الوراثية إلى خلفية جيدة من علوم كثيرة ومنها الكيمياء والكيمياء الحيوية والإنزيمات وعلوم الكائنات الحية الدقيقة ومنها بالذات البكتيريا والفطريات والفيروس وعلوم الوراثة والخلية والوراثة السيتولوجية وأيضاً علوم النبات وكثير من علوم الزراعة وأيضاً علوم الحيوان وأيضاً علوم الطب والصيدلة وخاصة فسيولوجى الإنسان ولذلك فإنه من الصعب تأليف مؤلف واحد فقط عن الهندسة الوراثية ولذلك فإن هذا الكتاب سيكون إن شاء الله أول مؤلف فى هذه السلسلة والتى ستصدر تباعاً. هذا الكتاب يضم كثير من أساسيات الهندسة الوراثية وسيتم إستكمال الكثير منها فى مؤلفات تالية إن شاء الله.

سيتم إستخدام إصطلاح توطين الجين Gene cloning بدلاً من الإستنساخ فى هذا الكتاب لأن هذه التسمية أفضل وأدق علمياً.

بعد إنتشار مؤلفاتى السابقة فى العالم العربى وحيث يصلنى عنها خطابات من جميع الدول العربية من الجزائر والمغرب غرباً إلى السعودية والعراق شرقاً واليمن والسودان جنوباً فإننى أهدي هذا المؤلف إلى جميع قراء العالم العربى وهو شامل ومبسط وحديث.



هذا المؤلف شامل ومناسب لخريجي كليات الزراعة والعلوم والتربية والطب والطب البيطري والهندسة الصحية والصيدلية وجميع المهتمين بالهندسة الوراثية في جميع المجالات السابقة.

أدعو من الله العلى القدير أن يلهمنى الصواب ويوفقنى فى مؤلفات قادمة.

”إنما يخشى الله من عباده العلماء”

**المؤلف**



## المحتويات

الصفحة

الموضوع

### الجزء الأول

١٥	الباب الأول: الأحماض النووية
٨٥	الباب الثاني: البروتينات
١١٥	الباب الثالث: تضاعف DNA
١٢٥	الباب الرابع: الشفرة الوراثية
١٥٣	الباب الخامس: توطين الجين
١٨١	الباب السادس: معالجة دنا النقي
٢١٩	الباب السابع: كيفية إختراق أو إدخال دنا الخلايا الحية
٣٠٩	الباب الثامن: البلازميدات
٣٩٩	المراجع

### الجزء الثاني

	الباب التاسع: بيولوجيا الفاج
	الباب العاشر: المتنقلات أو العناصر المتحركة
	الباب الحادى عشر: التحول البكتيرى
	الباب الثانى عشر: كيفية الحصول على على كلون نو جين معين
	الباب الثالث عشر: دراسة تركيب الجين والجينوم
	الباب الرابع عشر: دراسة تعبير الجين
	الباب الخامس عشر: تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة PCR
	معلق
	المراجع







**الباب الأول**

**الأحماض النووية**







## الأحماض النووية

### الأسماء الهامة في نشوء وتقدم الوراثة والهندسة الوراثية

- جريجور مندل عام ١٨٦٦ Gregor Mendel نشر أبحاثه عن الوراثة في البسلة وملاحظاته أن الصفات يتحكم فيها عوامل "discrete factors".
- أوسكار هيرتوج عام ١٨٧٥ (١٨٤٩-١٩٢٢) Oskar Hertwig. سيتولوجي ألماني شرح طريقة الإخصاب وتكوين الزيجوت.
- والثر فليمنج عام ١٨٧٩-١٨٨٥ (١٨٤٣-١٩٠٥) Walther Flemming. سيتولوجي ألماني. شرح سلوك الكروموسومات أثناء إنقسام الخلية وسماه .mitosis
- أوجست وايزمان عام ١٨٨٦ (١٨٣٤-١٩١٩) August Weismann. بيولوجي ألماني. نشر نظرية عن إستمرارية germ plasm خلال الأجيال المختلفة.
- ثيودور بوفيري عام ١٨٨٧-١٨٩٢ وآخرون (١٨٦٢-١٩١٥) سيتولوجي ألماني وصف الإنقسام الإختزالي وبالتالي أثبت تكهنات وايزمان عن وجود .reduction division
- هوجو دي فريز Hugo de Vries وعالم نبات ألماني كارل كورنيز Karl Correns (١٨٩٤-١٩٣٣) وعالم نبات نمساوي إريش فون تشير ميك Erich von Tschermak (١٨٧١-١٩٦٢). كل منهم مستقل على حدة أعادوا إكتشاف أبحاث مندل عام ١٩٠٠.
- والترستون عام ١٩٠٣ Walter Sutton (١٨٧٧-١٩١٦). سيتولوجي أمريكي ووضح ووصف سلوك الكروموسومات أثناء الإنقسام الإختزالي شارحا بذلك قوانين مندل وإقتراح أن الجينات موجودة على الكروموسومات.



- ويلهام جوهانسون عام ١٩٠٩ Wilhelm Johannsen (١٨٥٧-١٩٢٧):  
عالم نبات هولندي. ابتكر لفظ الجين.
- فرانس ألفونس جاتسينز عام ١٩٠٩ Frans-Alfons Janssens وصف العبور  
-crossing over
- توماس مورجان عام ١٩١٠ Thomas Hunt Morgan إكتشف صفات أو  
عوامل مرتبطة بالجنس sex-linked traits في حشرة الدروسوفيلا.
- ألفريد ستورتييفانت عام Alfred sturtevant (١٨٩١-١٩٧٠). عالم وراثة  
أمريكي. نشر لأول مرة في التاريخ خريطة وراثية لجينات حشرة الدروسوفيلا.
- كالفن بريدج عام ١٩١٦ Calvin Bridges (١٨٨٩-١٩٣٨). عالم وراثة  
أمريكي. أثبت نظرية الكروموسوم في الوراثة chromosome theory in  
-heredity
- هيرمان مولر عام ١٩٢٧ Herman Muller (١٨٩٠-١٩٦٧). عالم وراثة  
أمريكي. أثبت أن أشعة إكس يمكن أن تحدث طفرات.
- رونالد فيش عام ١٩٣٠ (١٨٩٠-١٩٦٢). عالم إحصاء إنجليزي. نشر كيفية  
أن الوراثة عامل هام في الانتخاب الطبيعي The genetical theory of natural  
selection. تعتبر مفتاح لتحديث نظرية دارون -a key work in neo-Darwinism
- جورج بيدل وإدوارد تاتم عام ١٩٤١ Edward Tatum, (١٩٠٣-١٩٨٩)  
George Beadle. عالمان أمريكيان. وقد نالا جائزة نوبل عام ١٩٥٨ في  
الفسولوجي والطب. وقد عملا سويا وقد بدءا العمل بطفرات في التغذية  
nutritional mutants لفطر Neurospora ومن هذه الأبحاث تمكنا من وضع  
نظرية جين واحد لإنزيم واحد one gene-one enzyme.
- أوزوالد أفرى وزملاؤه عام ١٩٤٤ Oswald and colleagues أثبت أن دنا  
عبارة عن مادة وراثية.



- إيروين شارجاف عام ١٩٤٧ Erwin Chargaff. أثبت أن النسبة بين البيريميدين والبيورين في دنا هي ١:١ .
- جيمس واتسن وفراנק كريك عام ١٩٥٣ James Watson and Francis Crick. إقترحا التركيب الجزيئي لدنا.
- جاك مونود وفراتسيوز يعقوب عام ١٩٦٠ Jacques Monod, Francois Jacob. عالمان كيمياء حيوية فرنسيان. أدخل اللفظ operon ليدل على أى مجموعة من الجينات النشطة تعمل مع بعضها وتكمل بعضها فى تفاعل أو تفاعلات معينة.
- مارشال نيرينبرج وفيليب ليدر عام ١٩٦١-١٩٦٦. وهما عالمان كيمياء حيوية أمريكيان Marshall Nirenberg (١٩٢٧)، Phillip Leder (١٩٣٤) وآخرون. فك شفرة الكود الوراثى the genetic code.
- بول برج عام ١٩٧٢ Paul Berg (١٩٢٦) عمل أول جزيئ دنا معاد صياغته Created the first recombinant DNA molecule وكان ذلك بواسطة الفاج لامدا Lambda Phage.
- ١٩٧٣ أول تجاب على تسخير الوراثة لتستخدم فى البكتيريا genetic manipulation تم عملها.
- والتر جلبرت وفريدريك سانجر عام ١٩٧٧ Walter Gilbert (١٩٣٢)، Frederick Sanger وزملائهم. علماء كيمياء حيوية أمريكيان. إخترعوا طرق لكشف تتابع القواعد فى دنا DNA sequencing.
- ١٩٧٨ تم إنتاج إنسولين الإنسان بواسطة بكتيريا مهندسة وراثية.
- كارى ميولليس عام ١٩٨٣ Kary Mullis (١٩٤٤). عالم كيمياء حيوية أمريكى. صمم تفاعل Polymerase chain reaction PCR لتكبير دنا.
- ١٩٨٣ أول نبات محول تم عمله First transgenic plant is created.
- أليك جيفرى عام ١٩٨٤ Sir Alec Jeffreys (١٩٥٠). عالم وراثة إنجليزى عمل وطور بصمة الأصبع الوراثية لدنا DNA (or genetic) fingerprinting.

- ١٩٨٨ لأول مرة فأر مهندس وراثيًا - فأر قابل للإصابة بالسرطان أو مصاب بالسرطان *a cancer prone mouse*.
- لأول مرة تجارب حقنية لنباتات طماطم مهندسة وراثيًا في الولايات المتحدة الأمريكية.
- بداية مشروع الخريطة الكروموسومية للإنسان بما تحمله من جينات *The human genome project*.
- ١٩٩٣ خروف محول أي مهندس وراثيًا لإنتاج بروتينات الإنسان في اللبن الناتج منه. أي إنتاج لبن به بروتينات الإنسان.
- الطماطم المهندسة وراثيًا تباع في الولايات المتحدة الأمريكية.
- إيان ويلموت عام ١٩٩٧ وزملاؤه *Ian Wilmut*. عالم وراثة بريطاني (إسكتلندي). أعلن عن مولد نعجة إسمها دوللي *Dolly*. وهو أول حيوان ثديي ينشت من تحضين خلية جسدية لحيوان بالغ.
- ١٩٩٨ أول تتابع القواعد كامل لطاخم وراثي لحيوان معقد *complex animal* (أي ليس من الحيوانات الأولية أو بسيط التركيب) وهو النيماتودا *Caenorhabditis elegans* تم نشره.
- ٢٠٠٢ أول قطعة مستنسخة إسمها سي سي.
- ٢٠٠٢ بداية إستنساخ الإنسان. تم بالفعل إستنساخ أول مولود في تاريخ البشرية وهو طفلة يوم ٢٧ ديسمبر في الولايات المتحدة الأمريكية بواسطة دكتورة بريجيت بواسوليه وهي فرنسية. والطفلة المستنسخة من أم عمرها ٣١ سنة وتم أخذ الخلية من جلدّها. إسم الطفلة *Eve* إيف.
- ٢٠٠٣ ثان مولود مستنسخ في إيطاليا في شهر يناير بواسطة سفيرينو أنيتوري.



## الأحماض النووية

## Nucleic Acids

### النواة والأحماض النووية:

#### Nucleus and Nucleic Acids

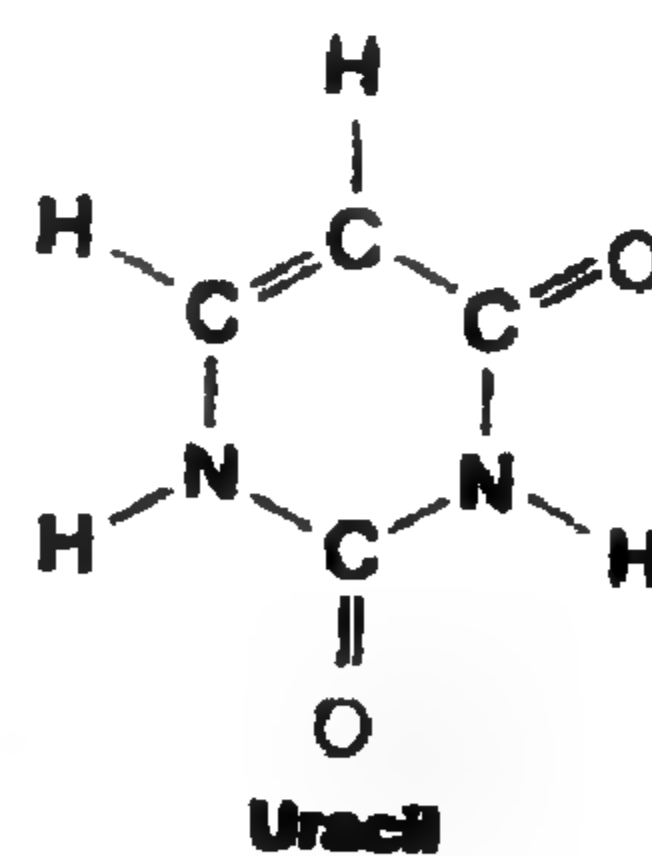
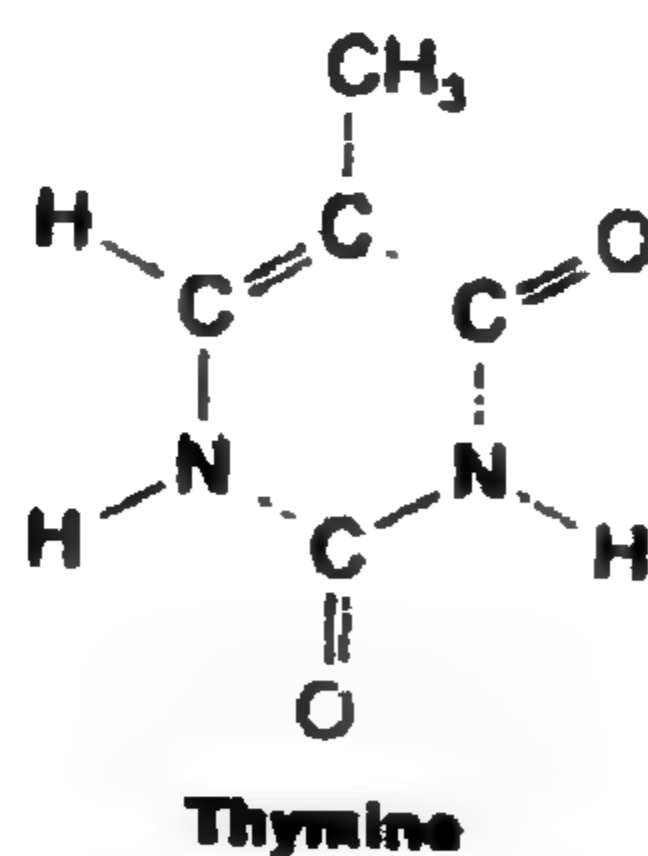
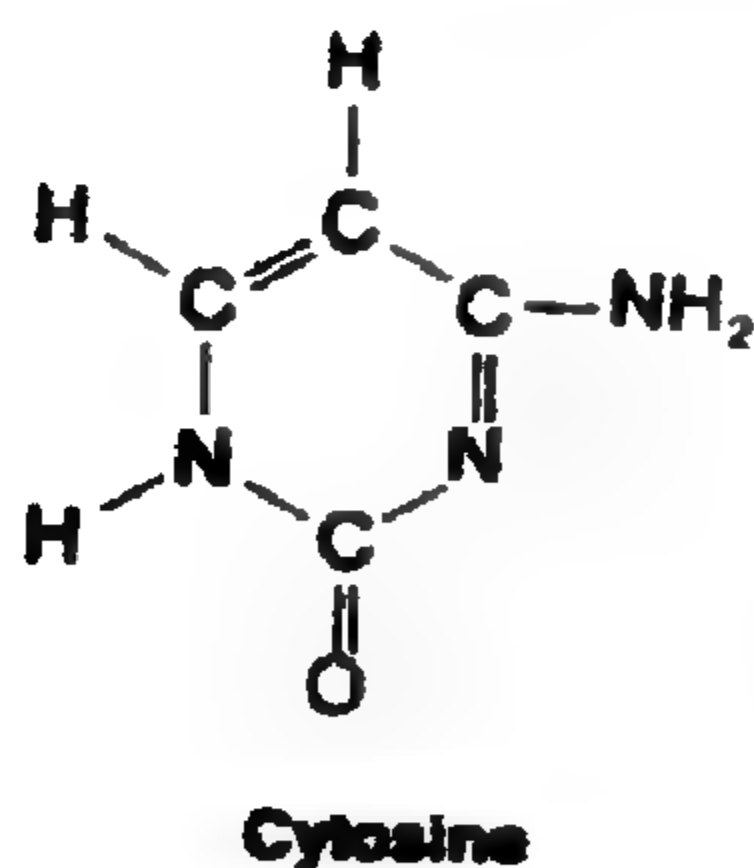
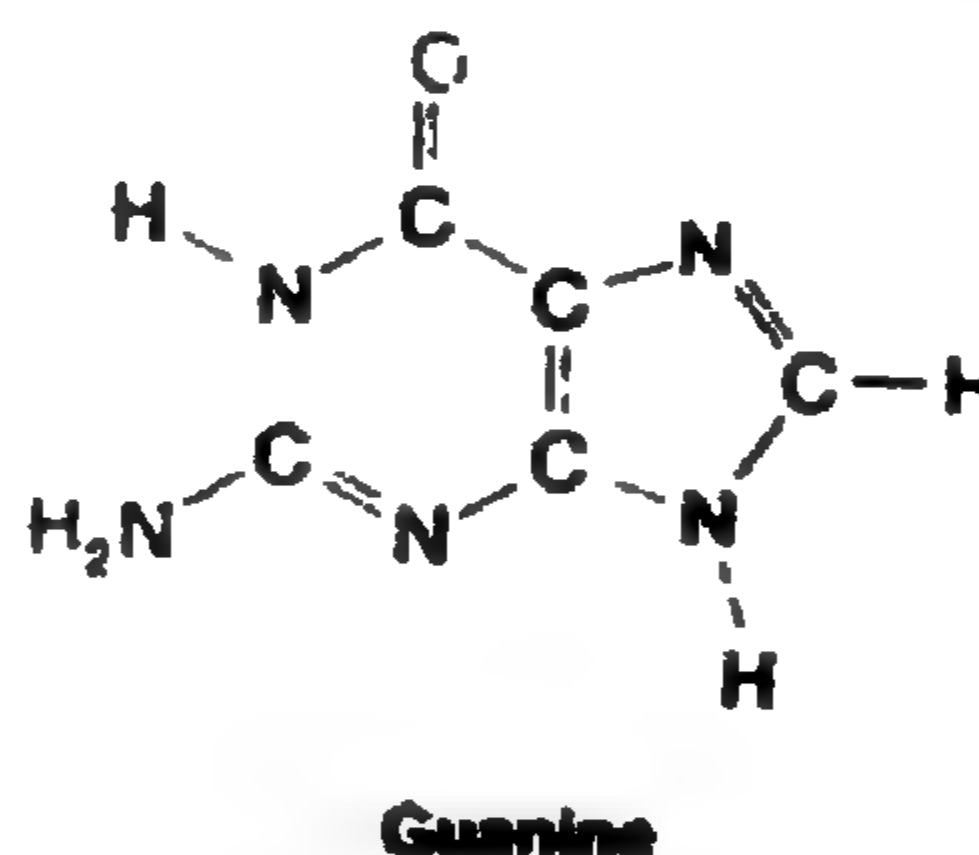
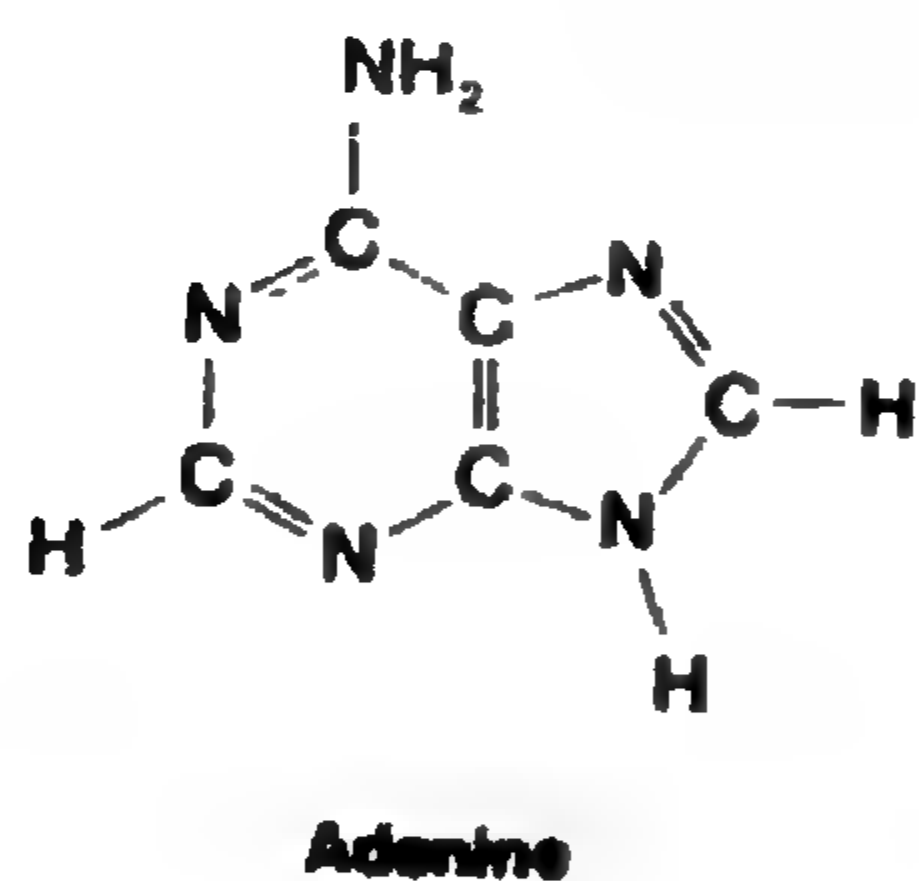
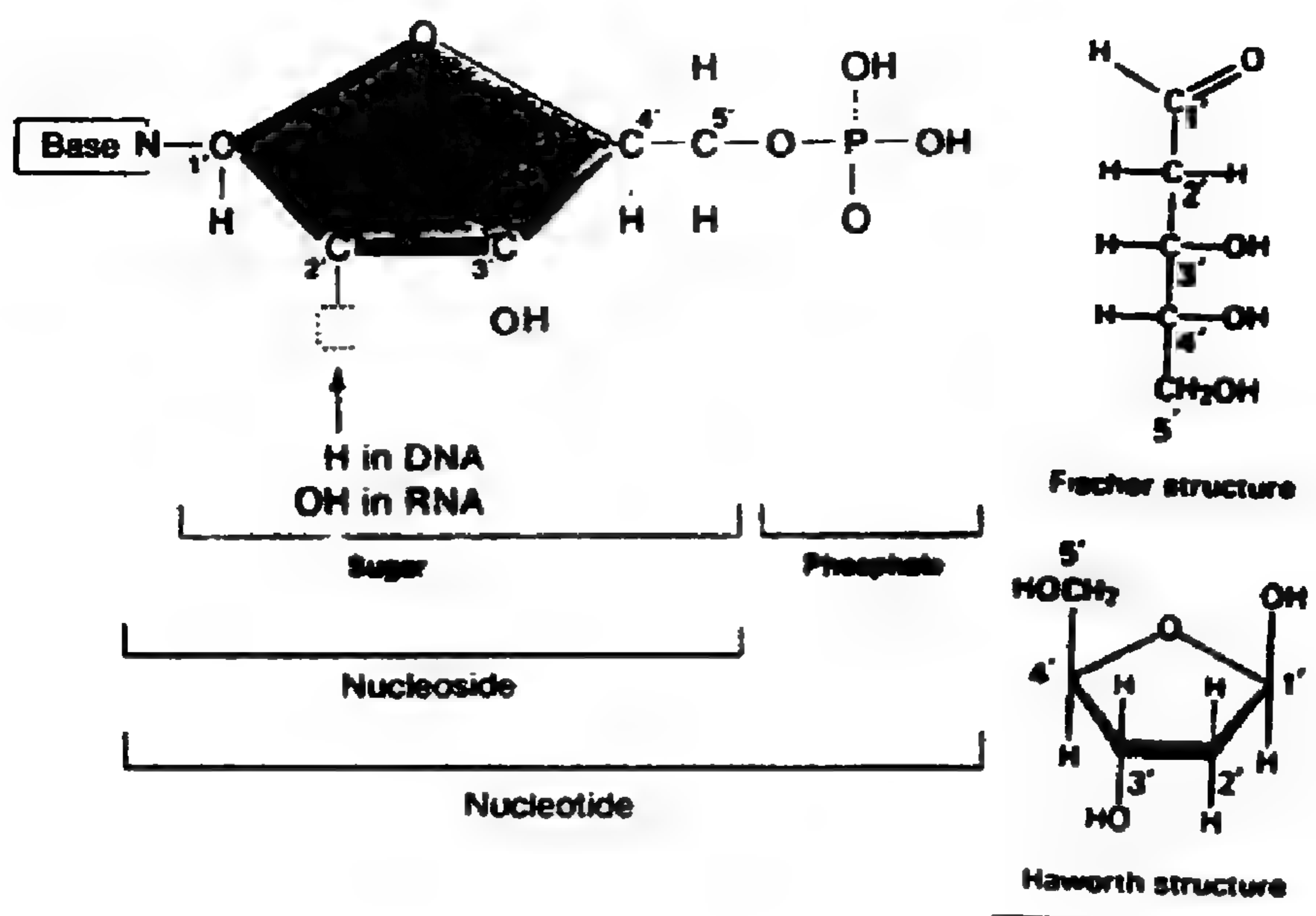
تقسم الكائنات الحية تبعاً لوجود النواة إلى ثلاثة مجاميع أو أقسام. المجموعة الأولى كائنات ذات نواة حقيقية eukaryotes وهي كائنات فيها نواة محددة وذات التركيب العام المميز المعروف حيث أن للنواة جدار محدد واضح وبداخلها نوية أو أكثر وسائل نووى وشبكة كروماتينية ومثال ذلك جميع النباتات وجميع الحيوانات سواء عادية أو كائنات دقيقة عدا ما سيلي ذكره في المجموعة الثانية. المجموعة الثانية كائنات بدائية النواة prokaryotes وهي ليس في الخلايا نواة محددة أى لا يوجد جدار للنواة ولا توجد النويات. ومثال ذلك البكتيريا والميكوبلازما والسبيروبلزما spiroplasma والطحالب الخضراء المزرقّة. المجموعة الثالثة ليس لها نواة أو شبه نواة مثل الفيروسات والفيروسيدات viroids بل يوجد دنا DNA أو رنا RNA محاط بالبروتين أو حر.

النواة جسم كروى أو بيضاوى عادة وتختلف في أحجامها كثيراً تبعاً لنوع الخلية ونوع النبات أو الحيوان، قد تتوسط الخلية وقد تكون جانبية. حالات كرات الدم الحمراء في الإنسان تكون خالية من النواة، حيث أن الخلية أثناء تكوينها تحتوى على نواة وعند النضج تفقد نواتها. وفي حالة خلايا السرطان تكون النواة ذات شكل غير طبيعى مشوه. وفي حالة الطحالب Acetabularia تكون متطاولة إسطوانية بدرجة ملحوظة. وفي حالة النبات فإن خلايا الأنابيب الغربالية الناضجة تكون عديمة النواة. ويرى البعض أن خلية الأنبوبة الغربالية تكون دائماً على صلة وثيقة بخلية مرافقة أو أكثر وكل خلية مرافقة لها نواتها التى تخدمها وقد تخدم الأنبوبة الغربالية المجاورة. تحتوى خلية النبات والإنسان والحيوان على نواة واحدة عادة إلا أنه فى

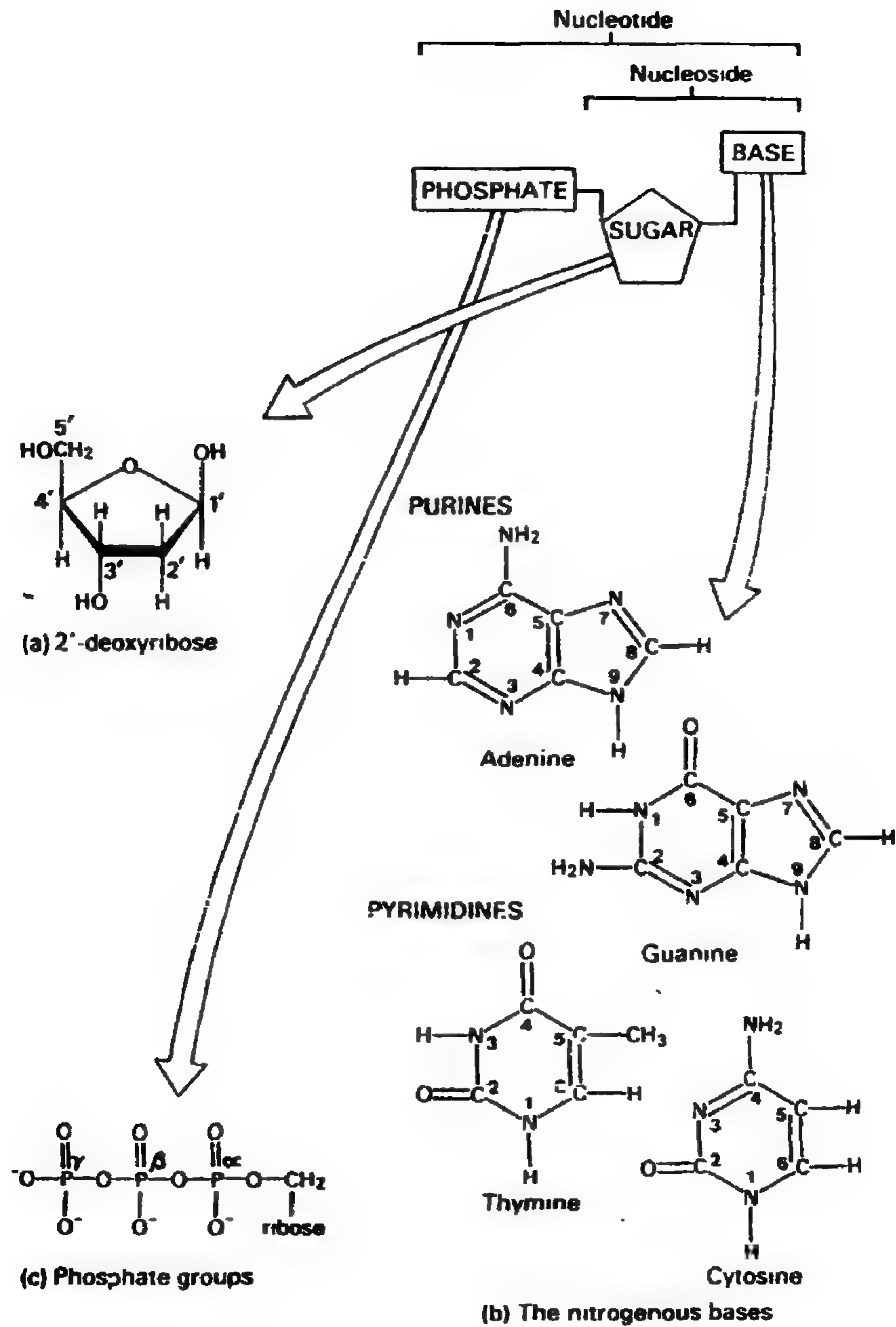
بعض الحالات كما في الأنابيب اللبنية latex tubes في النبات نجد أن الخلية الواحدة تحتوي على عدد من الأنوية. وفي بعض الفطريات نجد أن الخلية تحتوي على أكثر من نواة كما في الفطريات البيضية والزيجوية وفطر *Rhizoctonia solani* وقليل من الطحالب مثل الفوشيريا *Vaucheria*.

يوجد بالنواة نوعان رئيسيان من الأحماض النووية هما حامض الـ دي أوكس ريبوز النووى deoxyribonucleic acid واختصاره دنا والذي يرمز له بالرمز DNA وحامض الريبوز النووى ribonucleic acid واختصاره رنا والذي يرمز له بالرمز RNA. يتركب كل من الحامضين النوويين من وحدات تسمى نيوكليوتيدات nucleotides. يتكون كل نيوكليوتيد من جزيء من السكر الخماسى وجزيء قاعدة نووية أى قاعدة نيتروجينية وجزيء عبارة عن مجموعة فوسفات. يكون السكر الخماسى ريبوز فى حالة الحامض رنا والسكر الخماسى دى أوكس ريبوز فى حالة الحامض دنا. يختلف الريبوز عن الـ دي أوكس ريبوز فى أن الأول يوجد على ذرة الكربون رقم ٢ مجموعة أيد OH وأما الثانى فتوجد مجموعة أيد ناقصة أوكسجين أى توجد ذرة إيدروجين فقط بدلاً من مجموعة أيد (شكل ١).





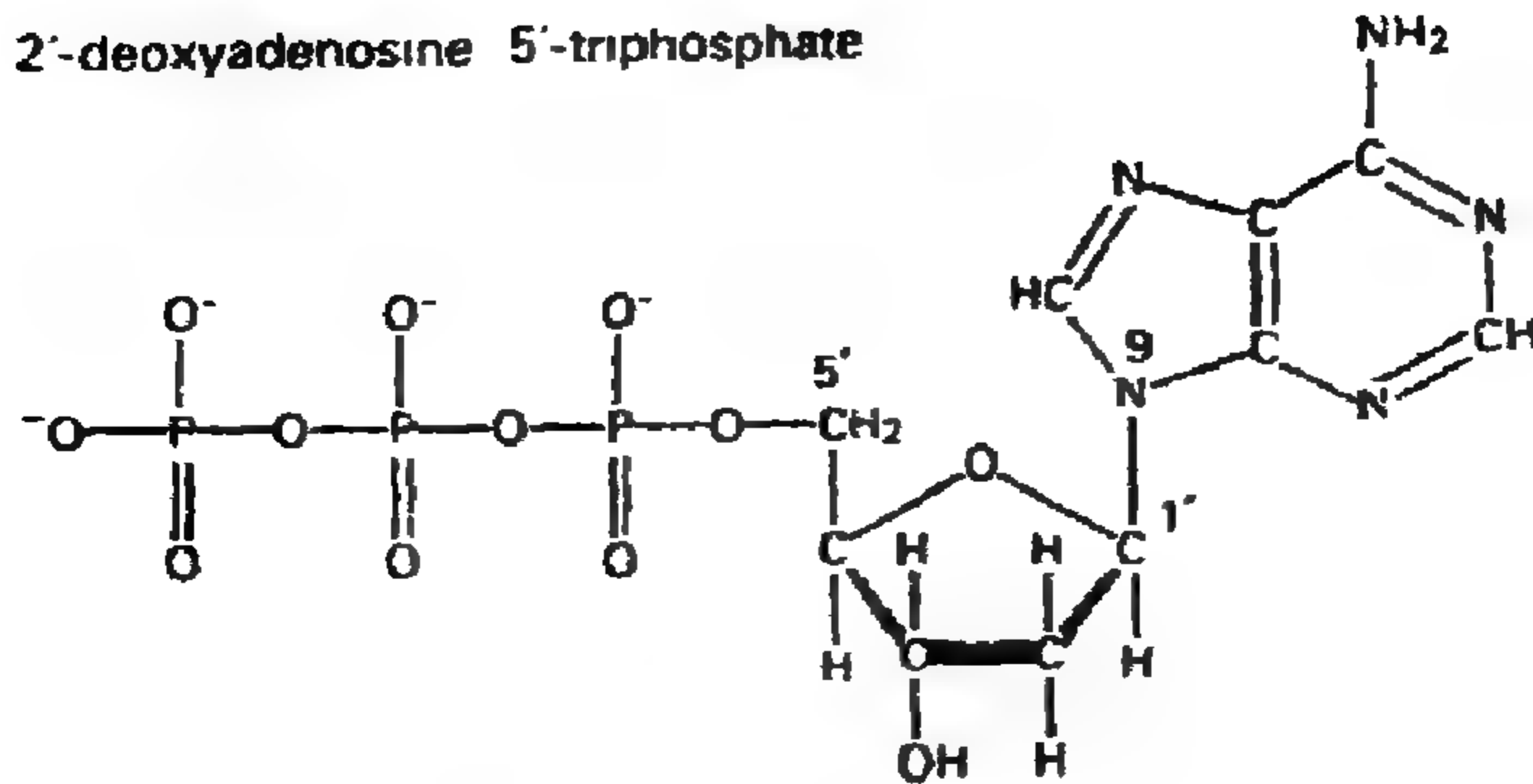
شكل ١: تركيب نيوكليوتيد والفرق بين دنا و رنا وتركيب نيوكليوسيد. البورينات (الأدينين والجوانين) البيريميدينات (سيتوسين وثيمين ويوراسيل). وتركيب دي أوكس ريبوز وشكله two structural forms.



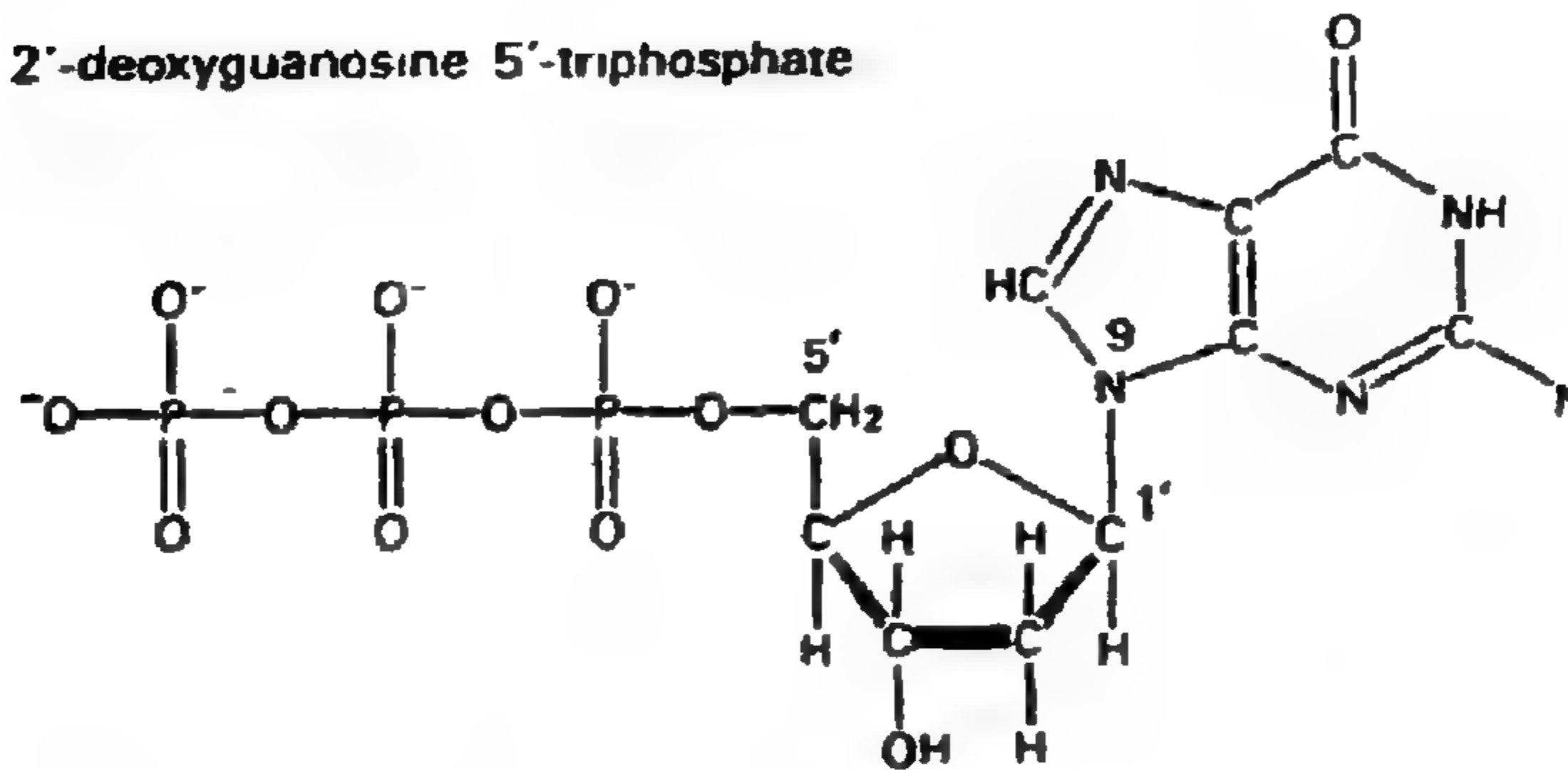
شكل ٢أ: تركيب ومكونات دي أوكس ريبونوكليوتيد deoxyribonucleotide.



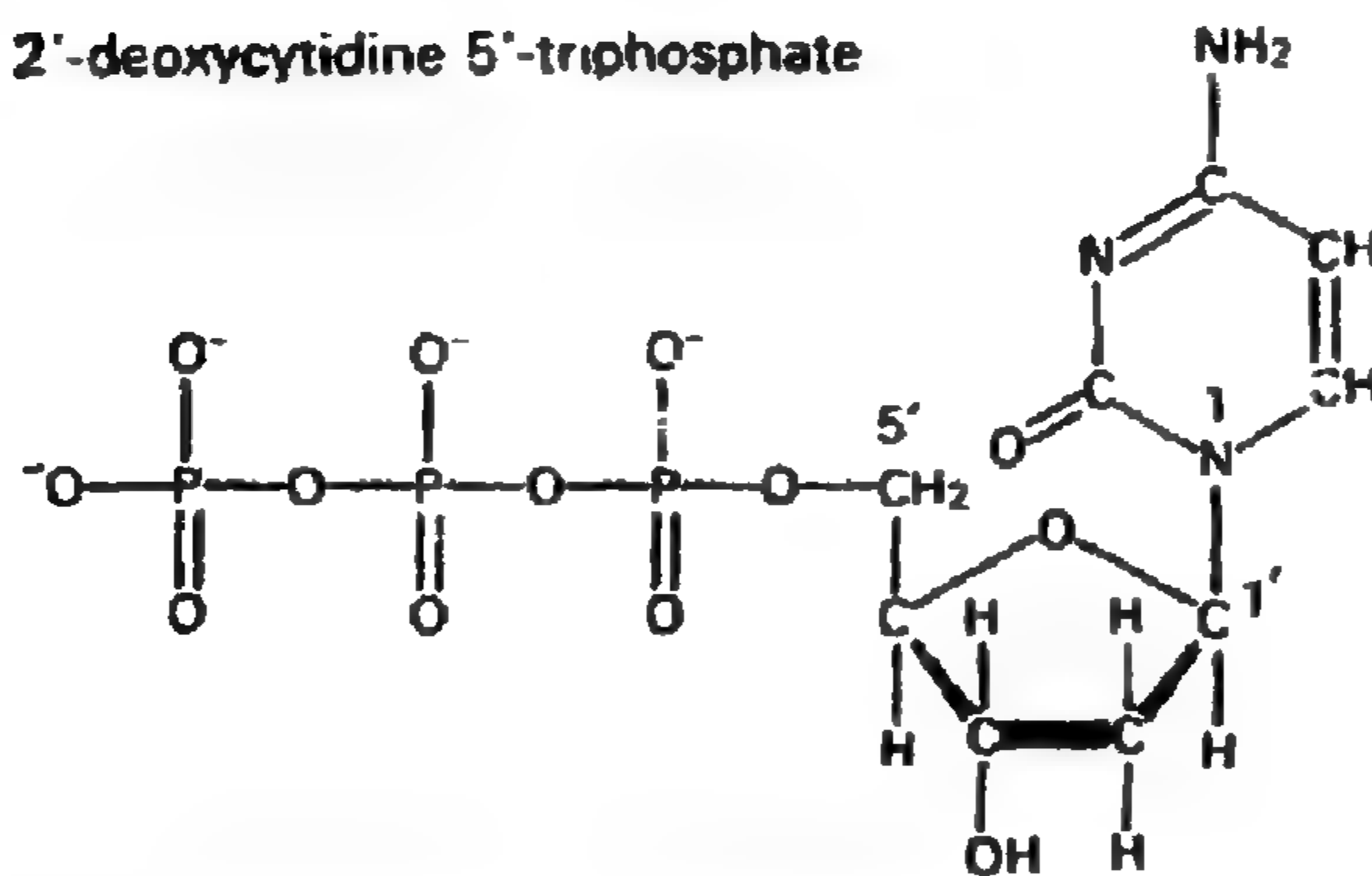
2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate



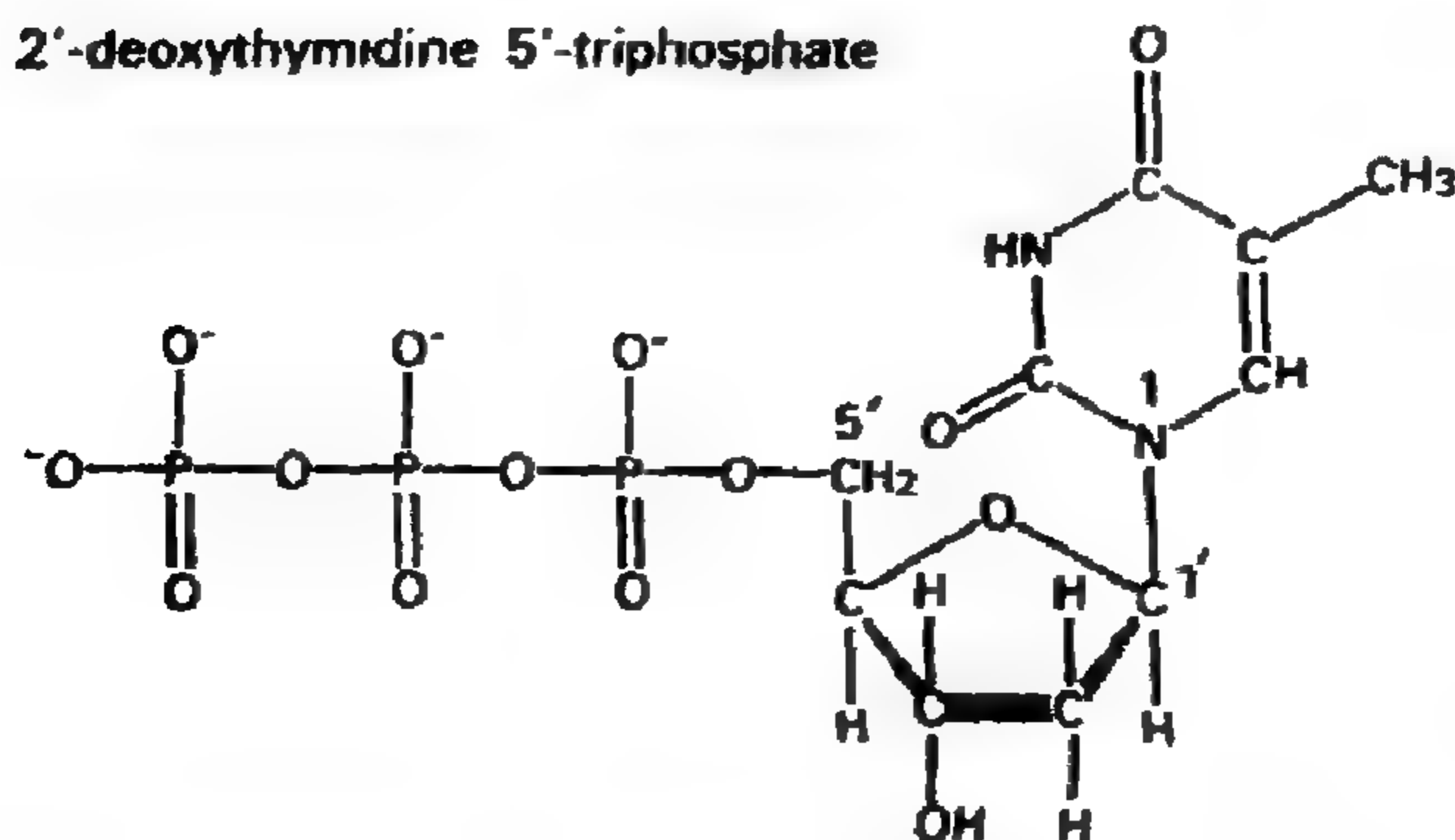
2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate



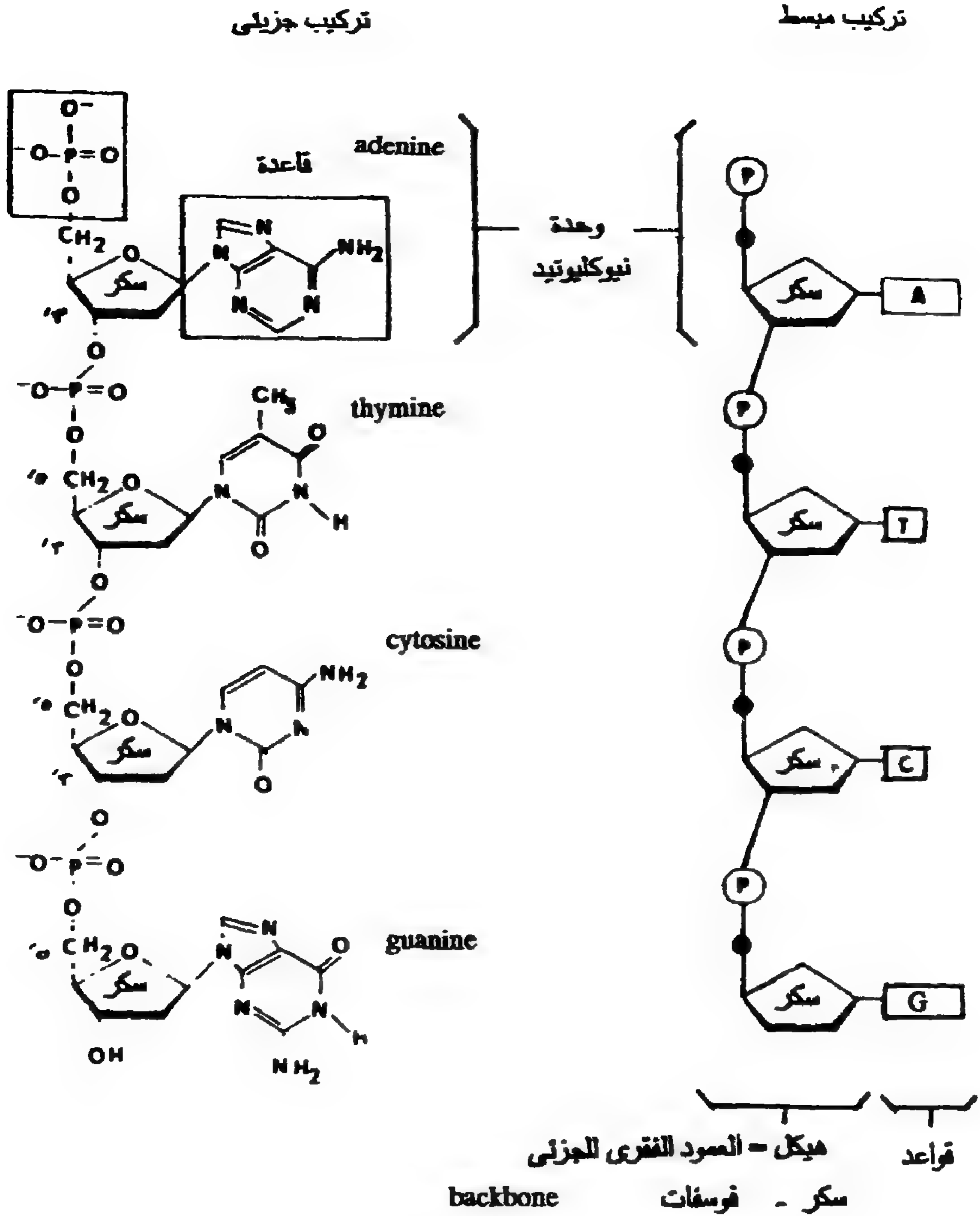
2'-deoxycytidine 5'-triphosphate



2'-deoxythymidine 5'-triphosphate



شكل ٢ ب: تركيب الأربعة نيوكليوتيدات لحمض دنا.



شكل ١٣: شظية من دنا تركيب مبسط وترتيب جزئى.

يرتبط مع السكر جزئىء فوسفات من ناحية وقاعدة نيتروجينية من ناحية أخرى. تتكون القاعدة النيتروجينية من أدينين adenine وجوانين guanine وسيتوسين cytosine يضاف إليهم ثيمين thymine فى حالة الحمض DNA ويوراسيل uracil

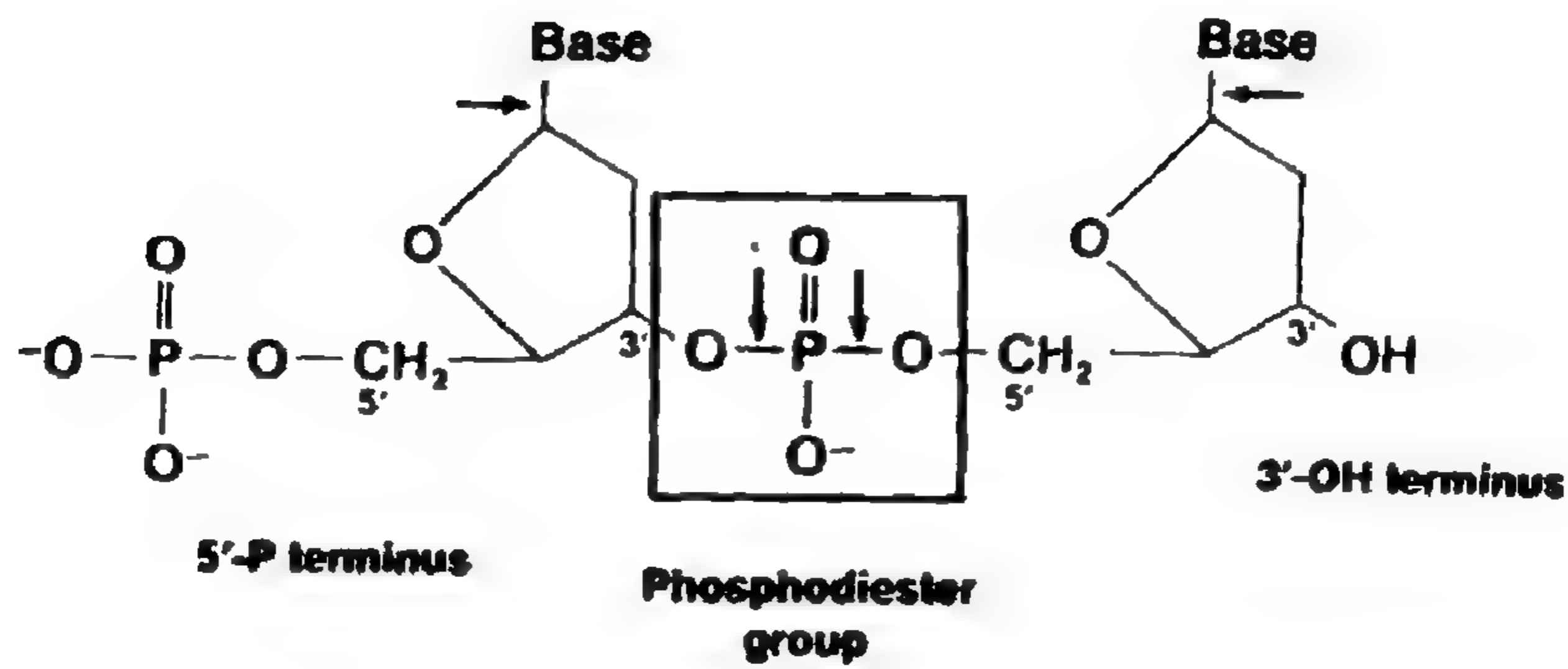


فى حالة الحمض RNA. القواعد النيتروجينية جزيئاتها حلقة فى تتكون من حلقة واحدة سداسية كما فى سيتوسين و ثيمين ويوراسيل وتعرف بالبيريميدات pyrimieines أو تتكون من حلقتين خماسية وسداسية كما فى أدينين وجوانين وتعرف بالبيورينات purines (شكل ١). ترتبط القاعدة النيتروجينية عند ذرة النيتروجين رقم ٩ مع ذرة الكربون رقم ١ فى السكر فى حالة البيورينات وذرة النيتروجين رقم ١ مع ذرة الكربون رقم ١ فى السكر فى حالة البيريميدات. ثم ترتبط مجموعة الفوسفات المسئولة عن الشحنة السالبة للأحماض النووية، مع السكر فى ذرة الكربون ٣ للسكر. ثم ترتبط مجموعة الفوسفات من طرفها الآخر مع جزيء سكر آخر مع ذرة الكربون ٥ للسكر. وهكذا يرتبط السكر مع جزيء بيورين أو بيريميدين بين ذرة السكر رقم ١ وبين ذرة النيتروجين ٩ أو ١، تبعاً للبيورين أو البيرويميدين. ويرتبط جزيء الفوسفات من أحد طرفيه بذرة الكربون رقم ٣ فى جزيء سكر وطرفه الآخر بذرة الكربون رقم ٥ فى جزيء سكر آخر (شكل ٢أ، ب). وهكذا يتكرر هذا الترتيب لتكوين عديد النيوكليوتيدات. وهكذا إن العمود الفقرى لجزيء عديد النيوكليوتيدات هى فوسفات وسكر (شكل ٣-٣) يسمى جزيء الفوسفات المتصل بالسكر من طرفيه بإسم ثنائى الإستر الفوسفورى (شكل ٣-ب).

Phosphodiester group. وهكذا فإن جزيء عديد النيوكليوتيدات فى حالة دنا و رنا يتكون من نيوكليوتيدات عديدة متصلة ببعضها البعض (شكل ٦).

الحامض النووى دنا عبارة عن سلسلتين حلزونيتين من النيوكليوتيدات تلتفان حوال بعضهما ويربط بين بعض القواعد فى السلسلتين روابط إيدروجينية. وهذه الروابط تربط بين أدينين فى سلسلة و ثيمين فى السلسلة الأخرى وأيضاً نفس الشيء بالنسبة لجوانين وسيتوسين (أشكال ٤، ٥، ٦). يوجد بين الثيمين والأدينين رابطتين إيدروجينيتين ولكن يربط بين جزيء السيتوسين والجوانين ثلاثة روابط إيدروجينية (شكل ٤). وهكذا فإن أحد طرفى جزيء دنا له طرف ٣ أى ثلاثة بشرطة علوية ويسمى 3'-OH terminus لأحد الحزوين أما الحزون الآخر

طرفه 5 ويسمى 5'-P-terminus أما الطرف الآخر لجزيء دنا أحد الحلزونين طرف 5' والذي نهايته في الطرف الأول 3' والحزون الثاني طرفه 3' والذي نهايته في الطرف الأول 5' أي أن الشريطين متوازيين ولكن خلف خلف antiparallel (شكل ٥). الشرطة التي توضع فوق 3 و 5 هي prime لتمييز أرقام ذرات كربون السكر الخماسي عن ذرات القواعد النيتروجينية ومجموعة الفوسفات ولذلك فإن أي شرطة prime معناها رقم لذرة الكربون بالسكر.



شكل ٣ ب: تركيب نيوكليوتيدين. الأسهم الرأسية توضح الرابطتين في مجموعة ثنائي الإستر الفوسفوري phosphodiester والتي يحدث عندها دوران حر Free rotation. أما الأسهم الأفقية توضح الرابطة N الجليكوسيدية N-glycosidic bond والتي عندها القاعدة يمكن أن تدور بحرية freely rotate. وهكذا يتكون عديد النيوكليوتيدات من عديد من النيوكليوتيدات مرتبطة بواسطة phosphodiester group.

القاعدتين في كل زوج قواعد متزواجين أي مرتبطتين تقع في نفس المستوى أو المسطح plane. مستوى كل زوج عمودي على محور الحلزون helix axis.

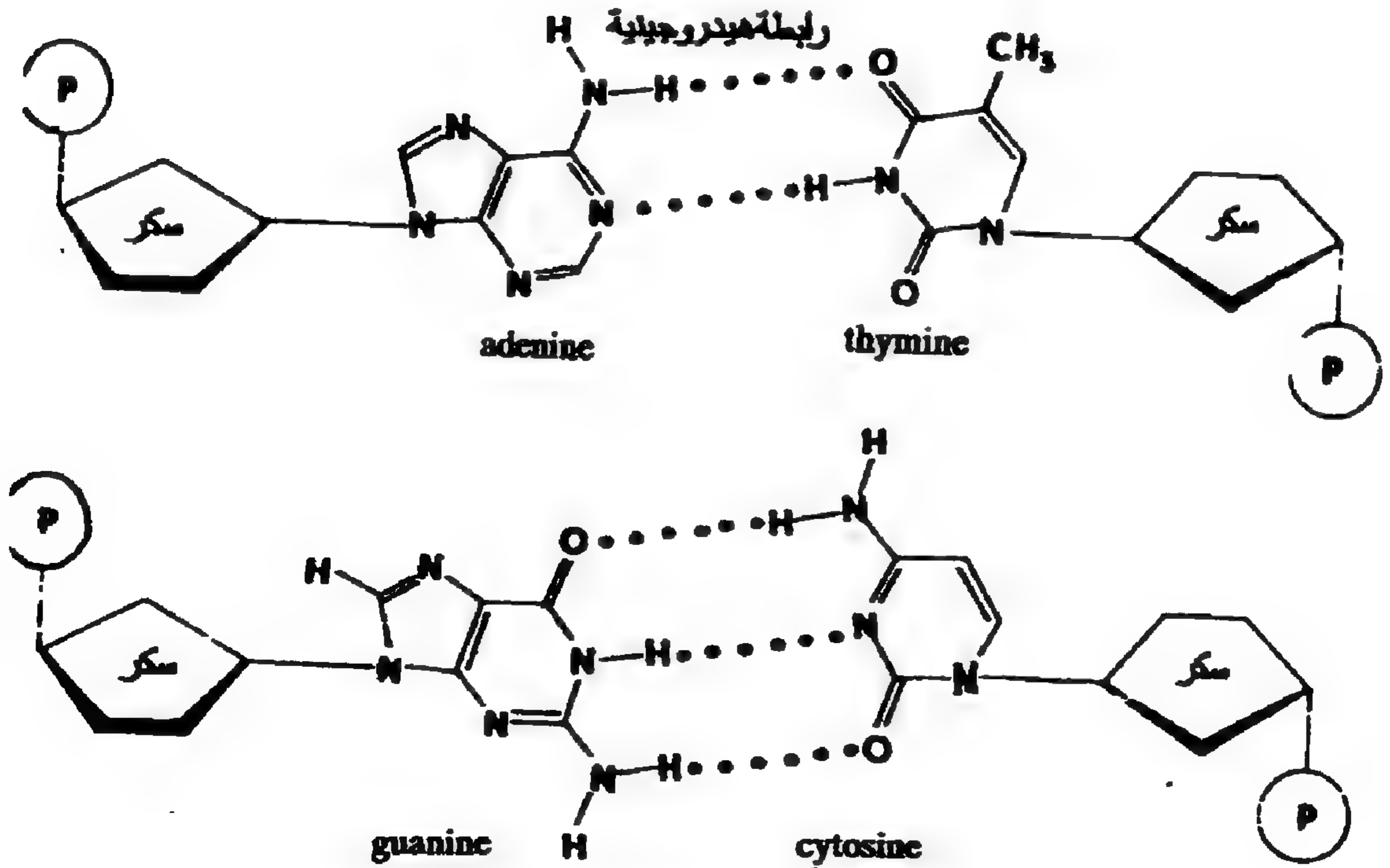
أزواج القواعد توجد في ترتيب دائري بجانب بعضها ولذلك فإنه يوجد ١٠ أزواج من القواعد لكل دورة حلزونية per helical turn. قطر الحلزونين double helix يكون ٣ نانومتر. الوزن الجزيئي لوحدة الطول للحلزون تكون ٢ × ١٠<sup>٦</sup> لكل ميكرومتر. وحيث أن الوزن الجزيئي لدنا البكتيريا يكون حوالي ٢ × ١٠<sup>٩</sup> فإن الجزيء طويل جداً نسبياً حيث يصل طوله ١ مم.



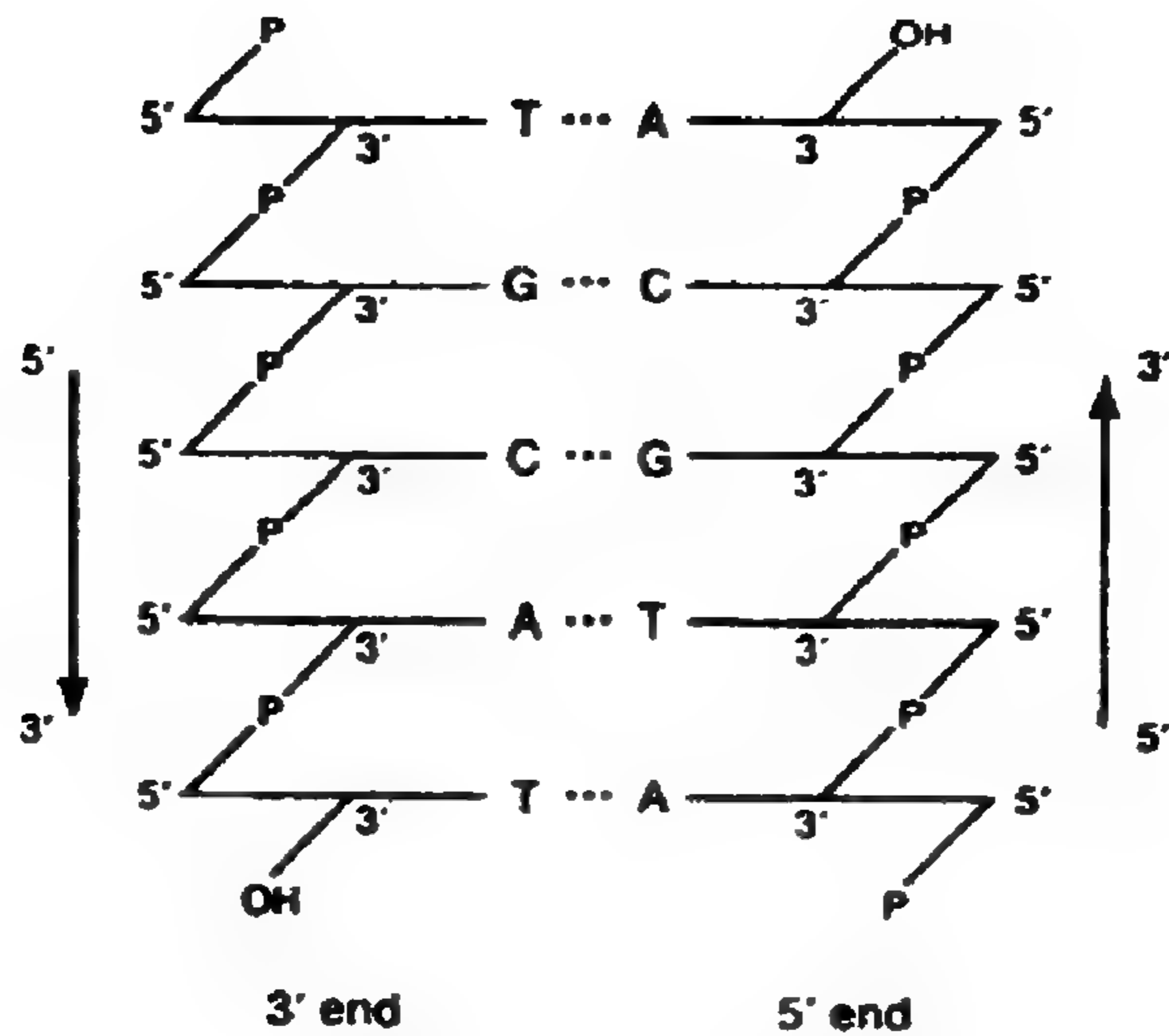
دنا يكون جزيء حلزون يميني right-handed helix. معنى ذلك أن الحلزون يوجد في اتجاه عقارب الساعة عن النظر للحلزون من أسفل. جزيء دنا له شقين حلزونيين خارجيين to external helical grooves. شق عميق واسع هو الشق الأكبر major groove وشق ضحل غير عميق ضيق يسمى الشق الأصغر minor groove (شكل ٧). أغلب البروتينات النووية تكون مرتبطة بجزيء دنا في الشق الأكبر.

جرى العرف على أن تكتب تتابع القواعد في الحلزون دنا بكتابة النهاية 5' على اليسار ومثال لذلك لكتابة الثلاثة نيوكليوتيدات ATC تكون هي كالآتي:

OH - 3' - ATC - 5' - P يمكن كتابتها أيضاً pApTpC.



شكل ٤: تزاوج القواعد الموجودة في دنا وتكوين الروابط الإيدروجينية The two common base pairs of DNA.



شكل ٥: شكل تخطيطي لشظية segment (جزء صغير) من حلزون دنا DNA duplex يوضح توجيه خلف حلزوني دنا المتوازيين antiparallel orientation.

توضح الأسم الإتجاه 5' ← 3'. حيث أن مجموعة الفوسفات (P) ترتبط بذرة الكربون 3' لجزيء دى أوكسى ريبو (يمثل جزيء دى أوكسى ريبوز بخط أفقى) وأن مجموعة الفوسفات هذه ترتبط هذه بذرة الكربون 5' لجزيء دى أوكسى ريبوز آخر قريب.

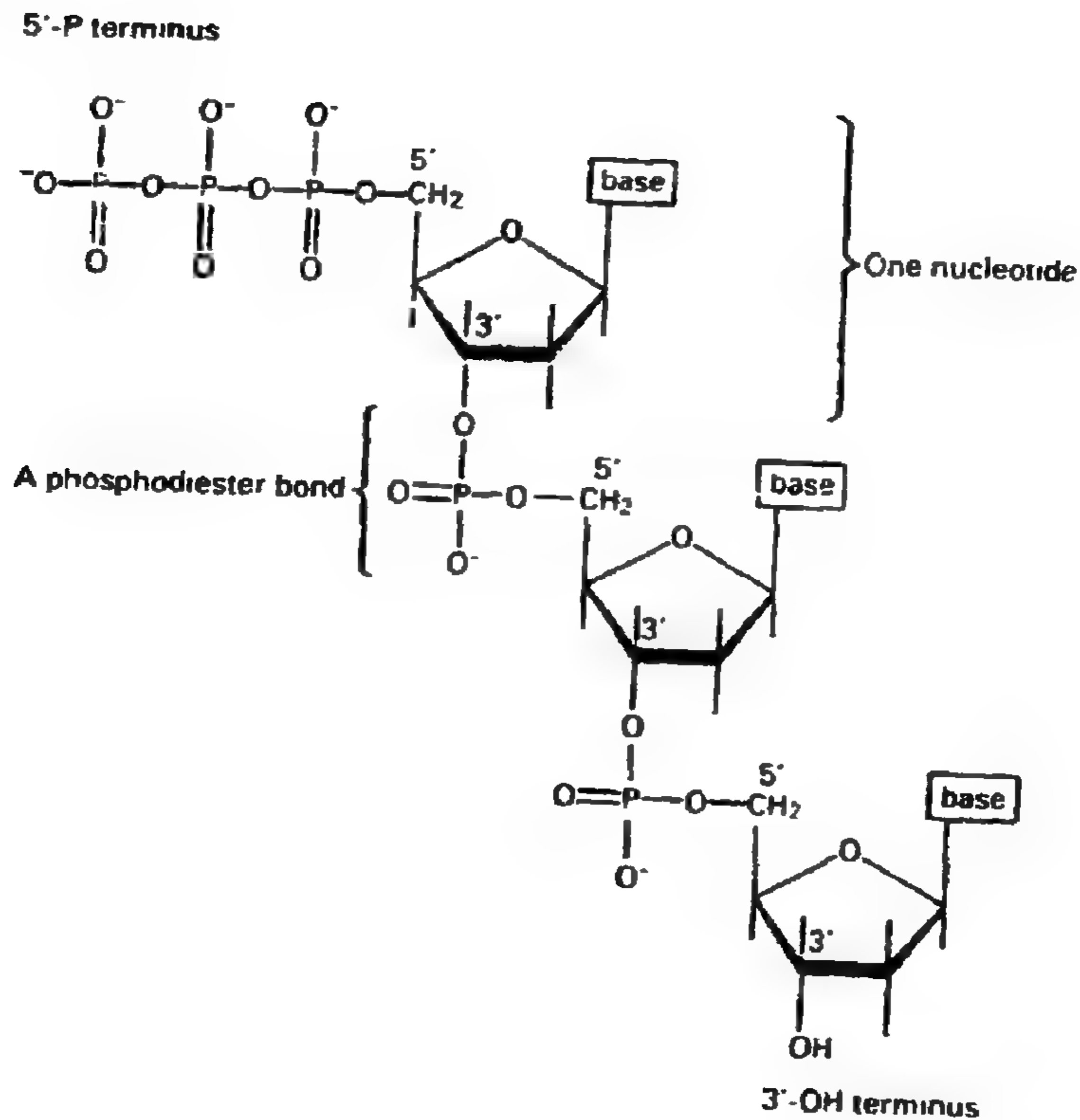
### أشكال وتركيب جزيء دنا:

#### DNA Conformations

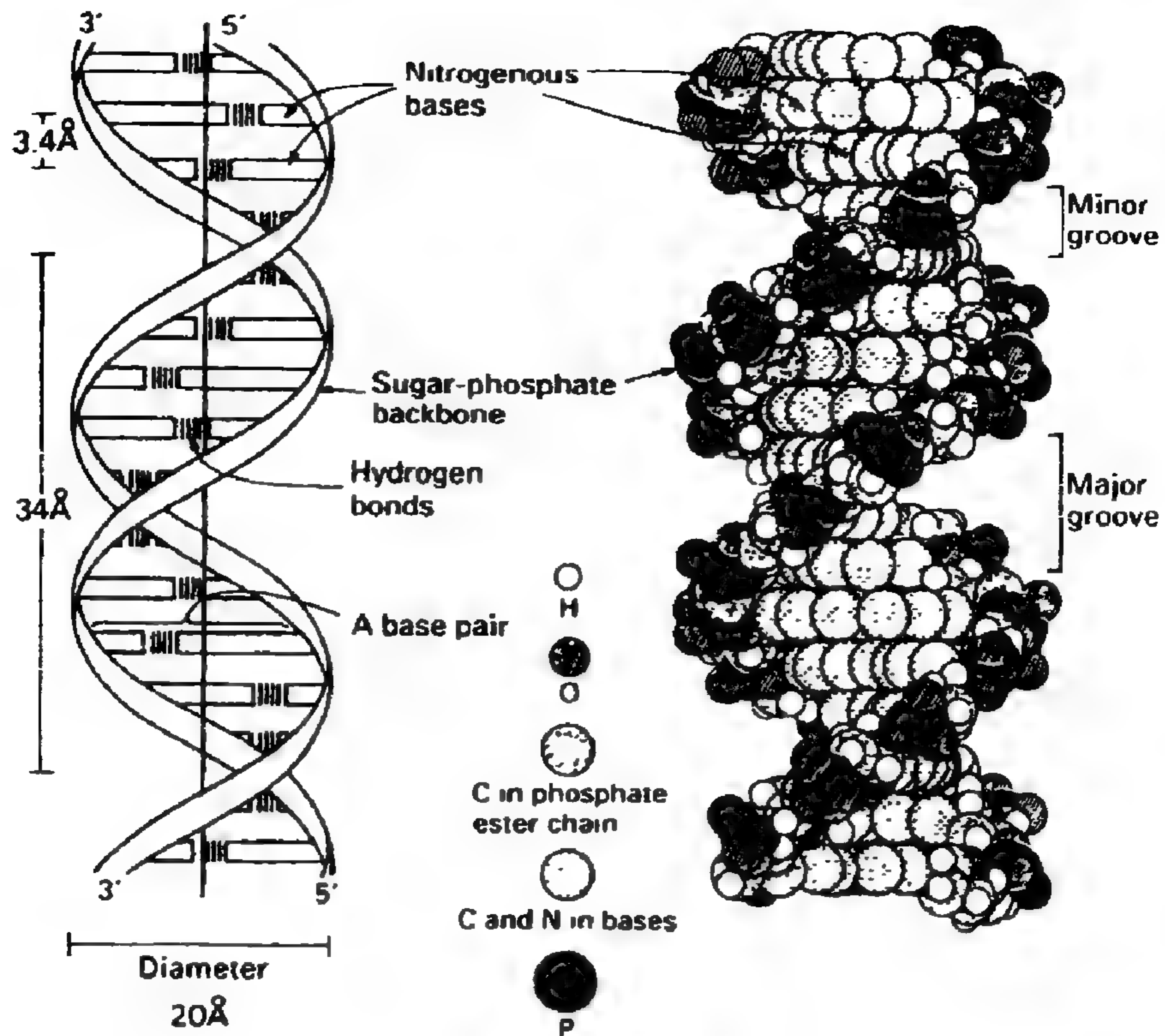
توجد ثلاثة حالات في هذا الصدد ومنها الحالتين الآتيتين. الشكل والتركيب الأكثر شيوعاً هو الشكل B أى B-DNA وهو يتميز بأنه إتفافه يمينى right handed when viewed end on وكل لفة بها أعلى قليلاً من عشرة قواعد (زوج) Just over 10 residues per turn. والشكل الثانى هو الشكل Z أى Z-DNA والذي ينشأ فى ظروف خاصة عندما يوجد تبادل فى تتابع قواعد البيريميدين والبيويميدى فى دنا ويكون إتفافه يسارى left handed helix وكل لفة بها ١١,٥ (زوج) قاعدة لكل لفة



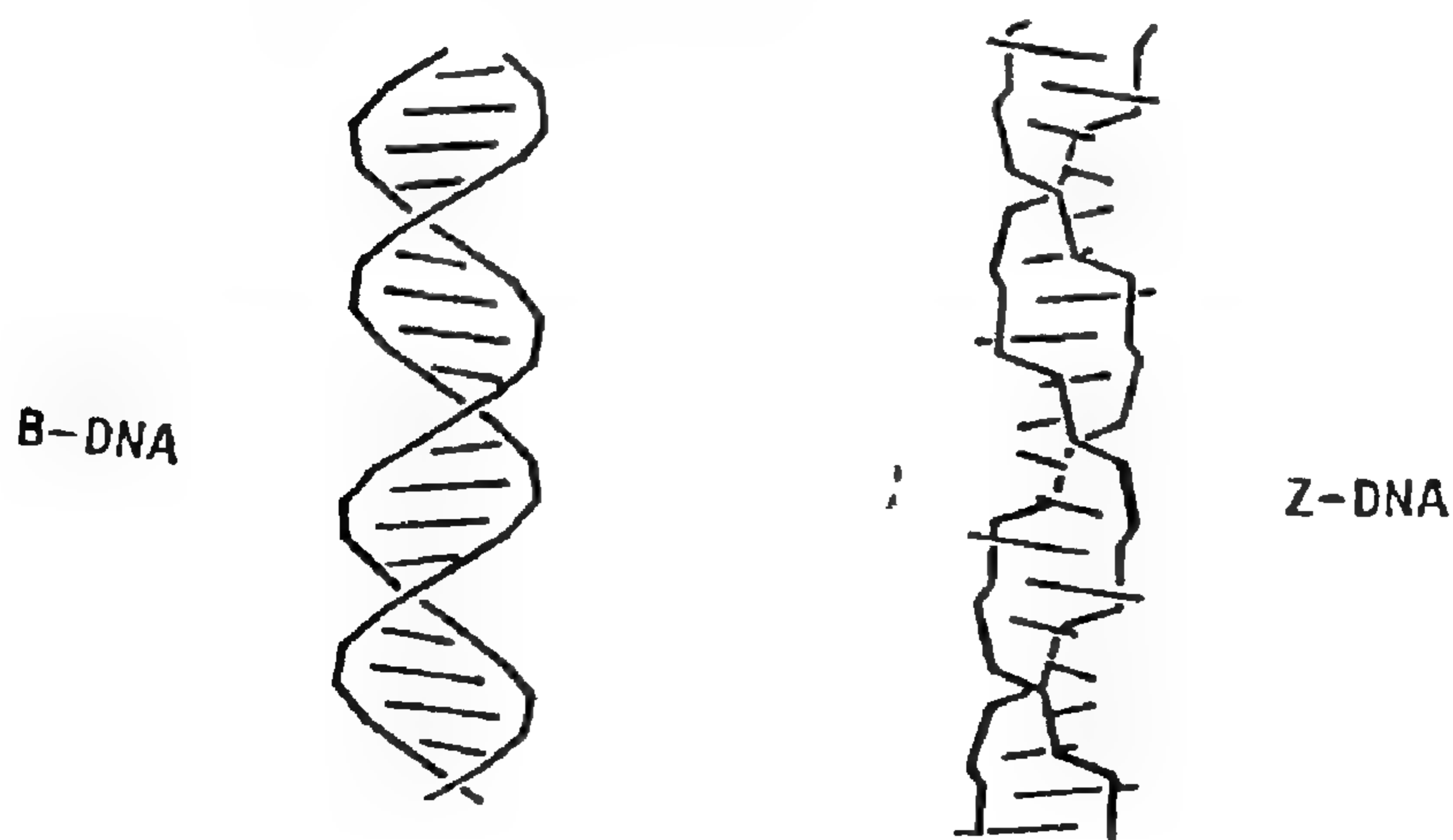
(شكل ١٧). يعتقد أن الشكل الأخير بعض الأهمية البيولوجية، حيث أنه يحدث تمدد stretches قصير لبعض البيورينات والبيريميدينات المتبادلة في مناطق عديدة من جزيء دنا في بعض أنواع دنا. يمكن التعرف على هذا النوع من دنا وذلك لأنه يرتبط بالأجسام المضادة antibodies. الأجسام المضادة تتعرف على هذا النوع من دنا. يمكن أيضاً لبعض البروتينات الأخرى خلاف بروتينات الأجسام المضادة، وقد تم إكتشافها، والتي يمكن أن تتفاعل مع دنا Z في كثير من الخلايا في الكائنات الراقية والحشرات والبكتيريا والفيروسات.



شكل ٦: تركيب قليل النيوكليوتيدات في دنا أو رنا  
 oligonucleotide of DNA or RNA أى تركيب جزء قصير من عديد النيوكليوتيدات  
 .The structure of a short polynucleotide



شكل ٧: تركيب دنا. على اليسار شكل مبسط والذي نشر بواسطة واطسن وكريك في حينه عند إكتشافه. وعلى اليمين شكل مجسم space-filling model في محاولة لتوضيح الأحجام النسبية للذرات في جزء دنا وترتيبها.



شكل ٨: طول جزء من حلزون دنا يتكون كل منهما من ٢٠ زوج قاعدة يوضحان الفرق بين الشكل أو النوع B والشكل أو النوع Z.

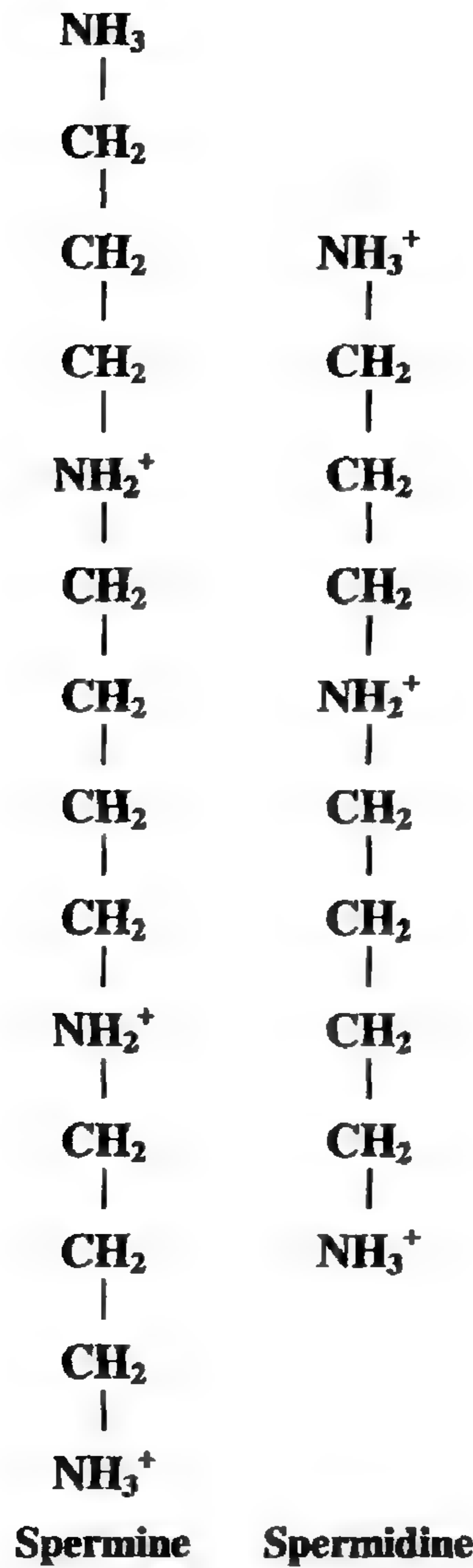


يوجد إختلاف كبير فى القابلية للماء أى للإمتزاج بالماء حيث أن القلب أى القواعد المرتبطة المكونة قلب جزيء دنا تكون كارهة للماء hydrophobic فى حين أن العمود الفقرى للجزيء أى الجزء الخارجى عبارة عن السكر المفسفر يكون محب للماء hydrophilic (شكل ٧ب) بدرجة شديدة ولذلك فإن الإختلاف بينهما شديد فى هذه الصفة.



شكل ٧ب: المناطق المحبة للماء والكارهة للماء فى جزيء دنا.

التنافر المتبادل mutual repulsion بين شحنات مجاميع الفوسفات تسبب تواجد السلسلة فى شكل وتركيب خط مستقيم straight-line configuration. لو تم معاملة الشحنات وذلك بتفاعلها مع بعض امجاميع القاعدية الأخرى basic groups وذلك لتكوين ما يسمى بقنطرة الملح salt bridge formation فإن السلسلة تصبح أكثر مرونة. يمكن أن تكون هذه المجاميع القاعدية هى الجانب القاعدى لسلاسل البروتينات. عامة خلاف البروتينات فإنه توجد بعض المركبات توجد ملازمة ومتصلة لبعض الأحماض النووية وأن هذه المركبات المنخفضة الوزن الجزيئى (شكل ٧ جـ)، وهى عبارة عن مركبات عديدة الأمين polymines مثل سبرمين spermine وسبيرميدين spermidine، ويكون فى هذه الحالات من المطلوب أن يكون الجزيئى ذو شكل ملتوى متعرج متداخل where a highly convoluted structure is required. وهذه الحالة مثل البروتينات حيث أنه يحدث تفاعلات كارهة للماء وتكون مسئولة عن ثبات جزيء دنا. فى حالة حدوث التفاعلات الكارهة للماء تحتاج إلى حوالى ١٠٠٠ كالورى لكل جزيء أى لكل زوج قاعدة مسئولة عن ربط حلزونى دنا مع بعضها. لا يوجد تعارض بين ذلك وبين الروابط الإيدروجينية التى تتكون بين قاعديتين ليحدث إتصالها أى إزدواجها وتكون مسئولة عن ثبات جزيء دنا.



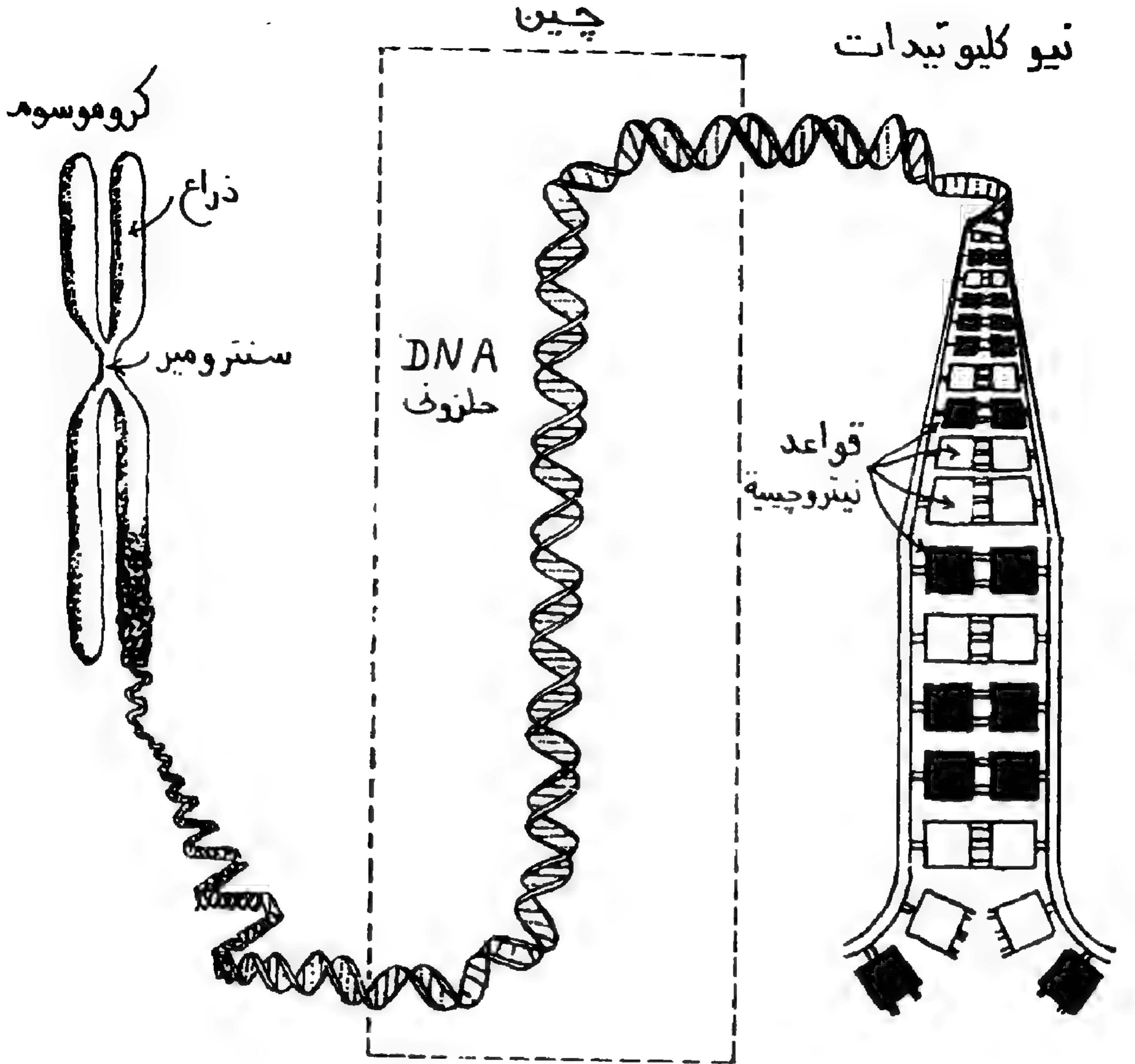
شكل ٧ جـ: عديدات الأمين التي ترتبط مع بعض أنواع الأحماض النووية.

حيث أن القواعد الإيدروجينية لا تتكون إلا بعد حدوث التفاعلات الكارهة للماء وطرد جزيئات الماء من بين حلزوني دنا. سنرى فيما بعد أن لحدوث الوظائف الحيوية لجزيء دنا وللأحماض النووية لابد من حدوث فك لتركيب دنا ثنائي الحلزون. وأنه لحدوث هذا الفك بين قاعدتين a single paire of bases فإنه يلزم ١٠٠٠ كالورى لكل جزيء. وبالطبع يحتاج دنا الذى يحتوى على آلاف من أزواج



القواعد لفكه unwind إلى كمية أكثر من هائلة من الطاقة. ولكن يجب أن نعظم أن فك دنا لا يحدث مرة واحدة بل يحدث تدريجياً على دفعات جزء صغير في الوقت الواحد small section of the chain unwinds at a time. ولذلك فإن هذا الجزء الصغير الذي فك يلتحم مرة أخرى ويفك جزء صغير آخر تال له، وهكذا يتكرر ذلك. ولذلك فإن اللخبطة disturbance في تركيب الجزيء تكون في جزء صغير فقط باستمرار بالتتابع وليست في كل الجزيء. وهكذا فإن الطاقة اللازمة للفك لا تكون كبيرة حيث أن الطاقة تكون لفك جزء صغيرة ثم يلتحم ثم تستخدم طاقة في فك جزء آخر صغير تال وهكذا تكرر العملية باستمرار ولذلك يحتاج جزيء دنا إلى جزء صغير من الطاقة اللازم لفك جزء صغير فقط. وهكذا يفسر ذلك كيف يتم تهيئة جزيء دنا لتكاثر أي لتكراره.

تحتوى النواة على صبغات أي كروموسومات كثيرة في الإنسان والحيوان والنبات وهي تختلف في عددها كثيراً في الحيوانات والنباتات المختلفة والكائنات الحية الدقيقة ولكن عددها ثابت في الإنسان. في نبات الذرة ٢٠ كروموسوم وفي القطن المصرى ٥٢ كروموسوم وفى القمح ٤٢ كروموسوم وفى قمح المكرونة ٢٨ كروموسوم. يتكون الكروموسوم عند بداية الإنقسام من كروماتيدين two chromatids وهي عبارة عن نصفين طويلين للكروموسوم أي للصبغى يتصلان ببعضها في الوسط بمنطقة تسمى السنترومير centromere. عند فرد الكروماتيد وحيث يكون حلزوني دنا ملتفان على بعضهما بشدة يصبحان حلزونين من دنا وكل جزء من هذا الجزيء دنا يكون عديد من النيوكليوتيدات والتي يتكون منها الجينات فقد يكون الجين كبيرة الحجم فيتكون من عديد من النيوكليوتيدات أي عدد كبير أو يكون الجين صغير الحجم فيتكون من عدد قليل نسبياً من النيوكليوتيدات وهكذا فقد يكون متوسط الحجم (شكل ٨).



شكل ٨: الكروموسوم والجين و DNA.

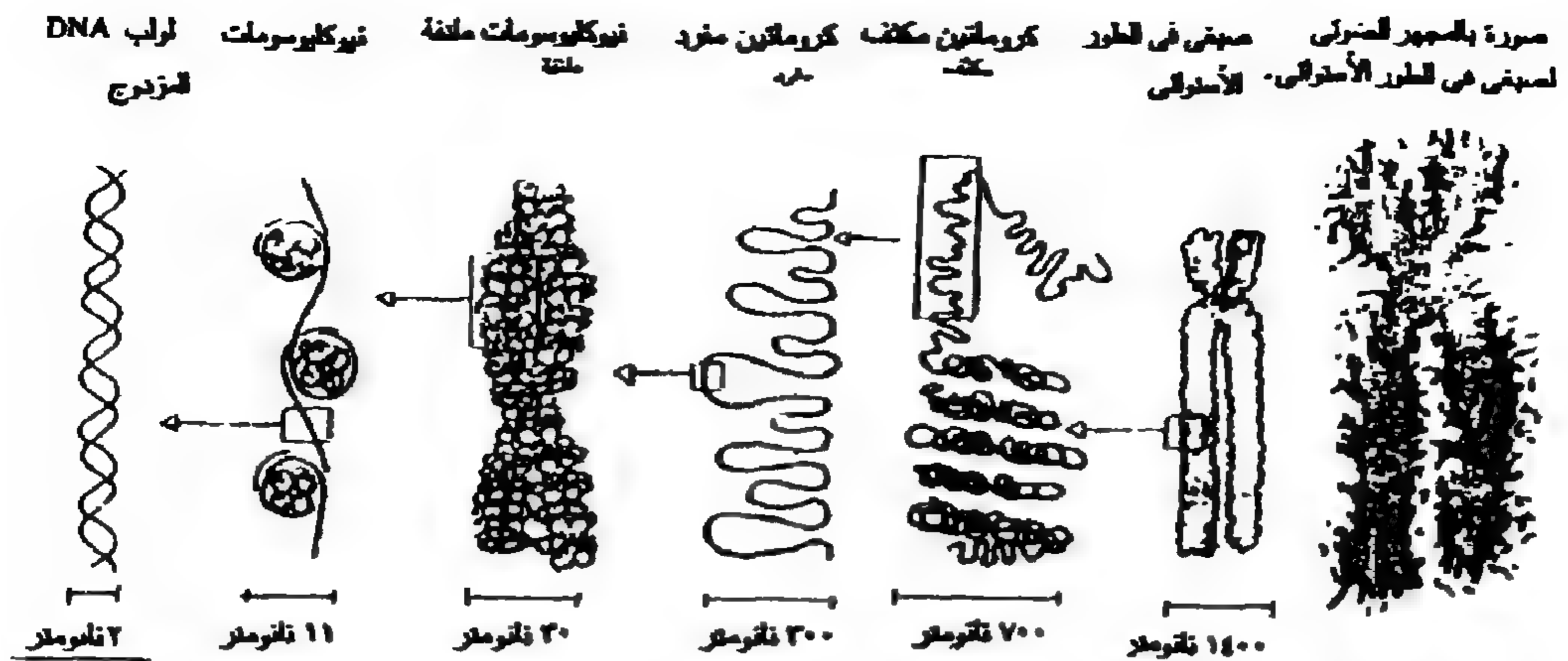
يكون تركيب الكروماتيد من حيث إنطواء جزيء دنا شديد في الإنسان والحيوان والنبات والكائنات الحية الدقيقة وفيما يلي وصف ذلك بالتفصيل في حالة كروموسومات الإنسان.



تحتوى الخلية الجسدية للإنسان على ٤٦ كروموسوم. فإذا تصورنا أنه أمكن فك اللولب المزدوج لجزيء DNA فى كل صبغى ووضعت هذه الجزيئات على امتداد بعضها البعض لوصل طولها إلى ٢ متر، والهستونات وغيرها من البروتينات هى المسئولة عن ضم هذه الجزيئات الطويلة لتقع فى حيز نواة الخلية والتى يتراوح قطرها من ٢-٣ ميكرون، ولقد أوضح التحليل البيوكيميائى وصور المجهر الإلكتروني أن جزيء DNA فى الصبغى يلتف حول مجموعات من الهستون مكونا حلقات من النيوكليوسومات nucleosomes (شكل ٩) مما يؤدى إلى تقصير طول جزيء DNA عشر مرات، إلا أنه يتعين أن يضم الجزيء ويقصر حوالى ١٠٠,٠٠٠ مرة حتى تستوعبه النواة، ولهذا فإن حلقات النيوكليوسومات تلتف مرة أخرى لتضم مع بعضها ومع ذلك فإن كل ما سبق ليس بكاف لتقصير جزيء DNA إلى الطول الملاحظ، وأشرطة النيوكليوسومات الملتفة بشدة ترتب على شكل حلقة كبيرة بواسطة البروتينات التركيبية غير الهستونية للكروماتين. والكروماتين المتلف والمكدس بشكل كبير يشار إليه على أنه مكثف، وعندما يكون جزيء DNA على هذه الحالة لا تستطيع الإنزيمات أن تصل إليه، ويتعين فك هذا الالتفاف والتكدس على الأقل إلى مستوى شريط من النيوكليوسومات قبل أن يعمل DNA كقالب لبناء RNA أو. عامة يعتبر الهستون أى بروتين الهستون كوسادة وظيفتها حماية جزيء دنا فى النواة.

ما تم شرحه هو للكروموسوم العادى فى الإنسان والنبات والحيوان والكائنات الحية الدقيقة ولكن يوجد شكل وتركيب آخر مخالف للكروموسوم عما سبق شرحه يوجد فى البكتيريا، وسيتم شرحه بالتفصيل فيما يلى. وحيث أن البكتيريا تستخدم فى الهندسة الوراثية وأيضاً لأهمية عمليتى transformation و transduction فى الهندسة الوراثية وحيث أن لجدار خلية البكتيريا والغشاء البلازمى والكروموسوم البكتيرى دور فى ذلك من حيث نقل وتوطين الجينات genes cloning فسيتم شرحها بالتفصيل فيما يلى.

genes closing فسيتم شرحها بالتفصيل فيما يلي :



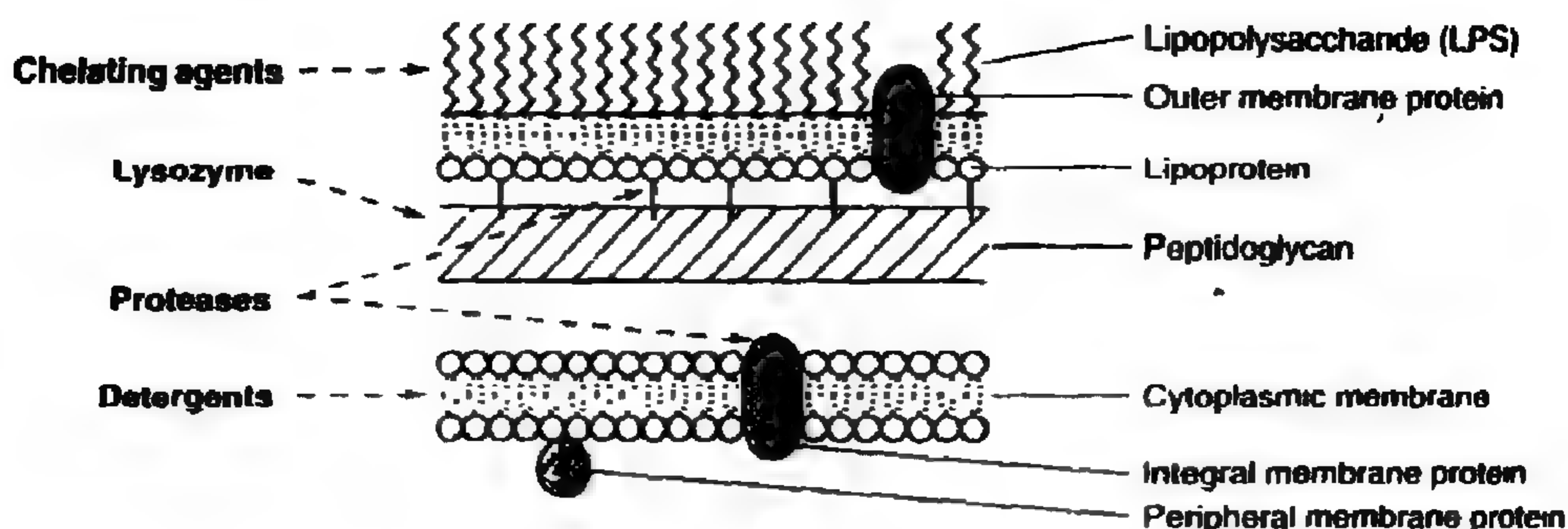
شكل ٩ : الطريقة التي يغلف بها DNA في الكروماتين

الجدار الخلوي والغشاء البلازمي البكتيري:

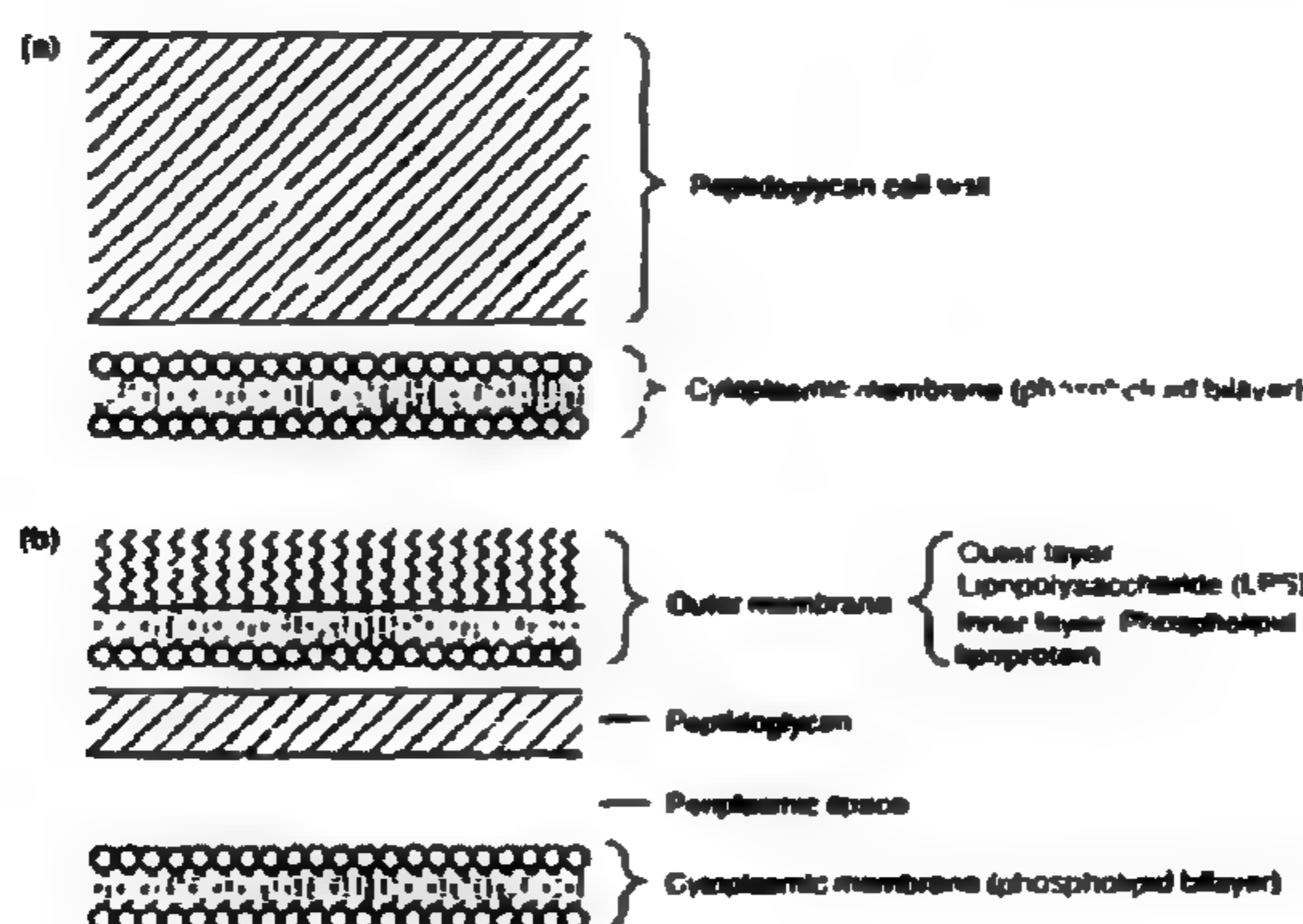
## Bacterial Cell Wall and Plasmms Membranes

تصنف البكتيريا إلى مجموعتين وهما سالبة لصبغة جرام وموجبة لصبغة جرام وذلك تبعاً لقابليتهم أى درجة إحتفاظهم بصبغة الكريستال البنفسجي الیودی Crystal violetiodine stain عند المعاملة بالكحول. تعتبر البكتيريت التي تحتفظ بهذه الصبغة موجبة لصبغة جرام والتي لا تحتفظ بهذه الصبغة سالبة لصبغة جرام. جدار خلايا البكتيريا السالبة لصبغة جرام مثل *E. coli*، و *S. typhimurium* أكثر تعقيداً من جدر خلايا البكتيريا الموجبة لصبغة جرام. تحاط البكتيريا السالبة لصبغة جرام بغشائين وهما الداخلى والخارجى ويفصل هذين الغشائين منطقة سائلة تسمى الفراغ البريبلازمى periplasmic space. توجد أيضاً طبقة رقيقة بين هذين الغشائين وتسمى هذ الطبقة طبقة الببتيدوجليكان peptidoglycan. فى حالة البكتيريا الموجبة لصبغة جرام بنقصها الغشاء الخارجى كما أن طبقة الببتيدوجليكان أكثر سمكاً مع عدم وجود فراغ بيريبلازمى (شكل ١١). يوجد منظر توضيحي لقطاع فى جدار خلية بكتيريا سالبة لصبغة جرام وأيضاً المواقع فى جدار الخلية التي تتأثر بالمركبات المخليبية chelating agents وأيضاً تتأثر بالإنزيمات المحللة للبروتين وأيضاً بالليزوزيم lysozyme والمنظفات detergents وهى موضحة بالأسهم المتقطعة (شكل ١٠).





شكل ١٠: شكل تخطيطي (كاريكاتيري cartoon) يبين جدار cell envelope لبكتيريا سالبة لصبغة جرام. المناطق القابلة للتأثير من الجدار بواسطة المركبات المخلية والليزوزيم والبروتينيز والمنظفات detergents مشار إليها بالأسهم المتقطعة.



شكل ١١: شكل تخطيطي (كاريكاتيري cartoon) يبين الفروق الرئيسية بين جدار الخلايا الموجبة لصبغة جرام (a) والسالبة لصبغة (b).

طبقة الببتيدوجليكان والتي يمكن رؤيتها كطبقة سميكة خارجية في حالة البكتيريا الموجبة لصبغة جرام تتكون من بلورة كل من وحدات سكر ووحدات ببتيد. يتم ربط السلاسل عديدة التسكر عرضياً بواسطة روابط عرضية أي يتقاطع معها عرضياً مركبات خماسية الببتيد أي ذات خمس جزيئات من الجليسين pentaglycine

peptide. والتركيب العام لطبقة الببتيدوجليكان هو عبارة عن طبقة مغلقة على نفسها تماماً لتكوين جزيء واحد كبير شبيه بالكيس one enormous saclike macromolecule يحيط ويغلف تماماً الغشاء الداخلى والسييتوبلازم فى خلية البكتيريا. تحدد طرق التقاطع العرضى cross-linking pattern للجزيئات السابقة أى الاختلافات فى أشكال ونظم التقاطع العرضى فى طبقة اللتيدوجليكان شكل كل نوع بكتيرى.

تعتبر طبقة الببتيدوجليكان هى الطبقة القابلة للتحلل بالإنزيم ليسوزيم lysozyme لأنها الطبقة الوحيدة الصلبة فى الجدار الخلوى. لذلك فإن معاملة أشكال مختلفة من البكتيريا مثل البكتيريا العصوية والكروية وغيرها من الأشكال بهذا الإنزيم يسبب تحلل الجدار وتصبح خلية البكتيريا كروية الشكل فى جميع الحالات السابقة وتسمى خلية البكتيريا المعاملة بهذا الإنزيم وذات الشكل الكروى بإسم البلاست الكروى sphaeroplast، أما عن آلية عمل البنسلين فإنه يتداخل مع تخليق الببتيدوجليكان أى أثناء تخليق الببتيدوجليكان أثناء نمو وكبر خلايا البكتيريا فى الحجم ولذلك تكون طبقة الببتيدوجليكان رقيقة جداً وضعيفة جداً أو حتى غير مكتملة التكوين ولذلك تصبح خلية البكتيريا النامية محاطة بجدار غير صلب أو حتى غير موجود ولذلك تكبر الخلية فى الحجم أى تنتفخ ويستمر الإنتفاخ حتى تنفجر الخلية ولذلك فإن البنسلين يقتل الخلايا النامية فقط دون الخلايا المسنة الغير نامية.

أما الغشاء السييتوبلازمى المبطن لجدار الخلية من الداخل والذي يسمى فى خلايا النبات بإسم البلازما ليما plasmalemma أو الإكتوبلاست ectoplast فإنه عبارة عن حاجز أسموزى والذي يتحكم فى نوع الجزيئات الخارجة والداخلية لخلية. إنتقال أو مرور الجزيئات عبر الغشاء يحتاج إلى جهاز ناقل transport system. بعض الجزيئات لا تدخل إلى الخلية لنقص فى جهاز النقل ومثال ذلك أن الغالبية العظمى من الجزيئات المفسفرة مثل النيوكليوتيدات لا يمكنها دخول الخلية. وجد أن معاملة خلايا البكتيريا بالتلوين وهو مذيب للدهون يسبب فساد دهون الغشاء السييتوبلازمى (الغشاء السييتوبلازمى يتكون من دهون وبروتين) وبالتالي فساد نفاذية الغشاء

السيتوبلازمى وفساد تحكم فى النفاذية. ولذلك تسمى الخلايا المعاملة بالتلوين خلايا مستحثة النفاذية permeabilized. هذه الخلايا مستحثة النفاذية لا يمكنها أن تنمو أو تنقسم ولكن يمكنها أن تقوم بكثير من التفاعلات الكيموحيوية. ومثال ذلك أن الخلايا مستحثة النفاذية تستعمل فى دراسة تخليق دنا حيث أن هذه الخلايا تسمح بنفاذية مركب deoxynucleoside triphosphate وهو المركب الأصل percursosor الذى يتكون من دنا مباشرة ومع العلم بأن الخلايا العادية لا تسمح بنفاذية ومرور المركب المذكور. وجد أيضاً أن الخلايا المستحثة مناسبة وملاتمة ومفيدة فى دراسة الإنزيمات ومثال ذلك دراسة تخليق إنزيم بيتا جالاكتوسيديز  $\beta$ -galactosidase والذى يعتبر مثال واضح لكيفية تنظيم تعبير الجين عن نفسه أى عن وظيفته regulation of gene expression. يتم عمل ذلك عادة باستخدام خلايا مستحثة قبل إضافة مادة تفاعل ملونة chromogenic substrate.

يعتبر الغشاء الخارجى outer membrane للبكتيريا السالبة لصبغة جرام معقد التركيب. حيث أن الجزء الداخلى من الغشاء والذى يتكون من طبقة مزدوجة من الدهون الفوسفورية والبروتينين phospholipids-protein bilayer يكون مغلف بواسطة مركبات عديدة التسكر دهنية lipopoly saccharides. يوجد للمركبات الأخيرة دور وقائى للخلية حيث نها تعطى أى تكون سطح محب للماء والذى يحمى الخلية من المركبات الكارهة للماء مثل أملاح المرارة والمنظفات detergents. يحتوى الغشاء الخارجى نوع من البروتين يسمى بوريينات porins والتي تكون ثقبون تسمح بدخول الجزيئات المحبة للماء الصغير الحجم ولكنها تمنع دخول الجزيئات الكبيرة الحجم مثل كثير من المضادات الحيوية.

يوجد بين الغشاء الخارجى والغشاء الداخلى فى الجدار منطقة مائية aqueous region تسمى منطقة الفراغ البريبلازمى periplasmic space. يتركز كثير من البروتينات فى منطقة الفراغ البريبلازمى. تشمل هذه البروتينات إنزيمات nucleases و proteases والتي تسبب كسر وتحطيم المركبات الكبيرة الحجم الغير قابلة للنفاذية

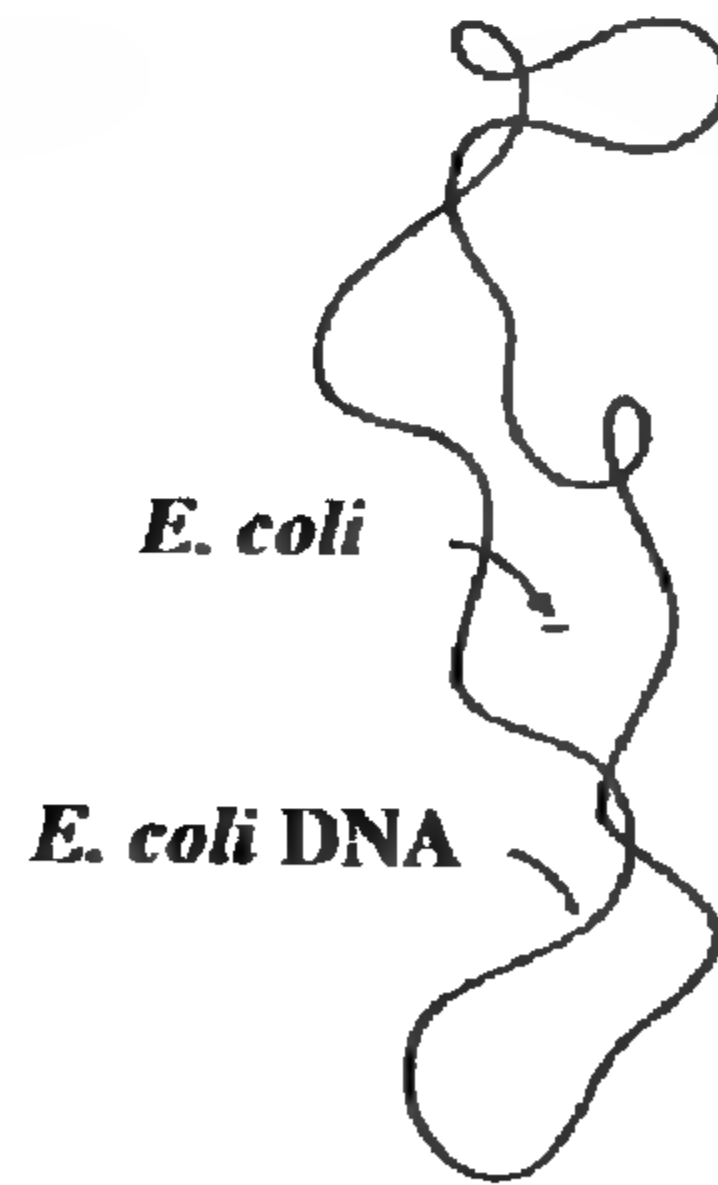


وبذلك يصغر حجمها وتصبح قابلة للمرور والنفاذية عبر الغشاء السيتوبلازمي أيضاً. تشمل هذه البروتينات أيضاً علاوة على الإنزيمات بروتينات ترتبط بأيونات معينة أو سكريات معينة أو أحماض أمينية ويمكن أن تسمى هذه البروتينات حاملات أو ناقلات الأيونات أو ناقلات الجزيئات *ions or molecules carriers*. هذه البروتينات الناقلة تسهل من نفاذية ومرور الأيونات والجزيئات عبر الغشاء الداخلي أى الغشاء السيتوبلازمي.

### الكروموسوم البكتيري

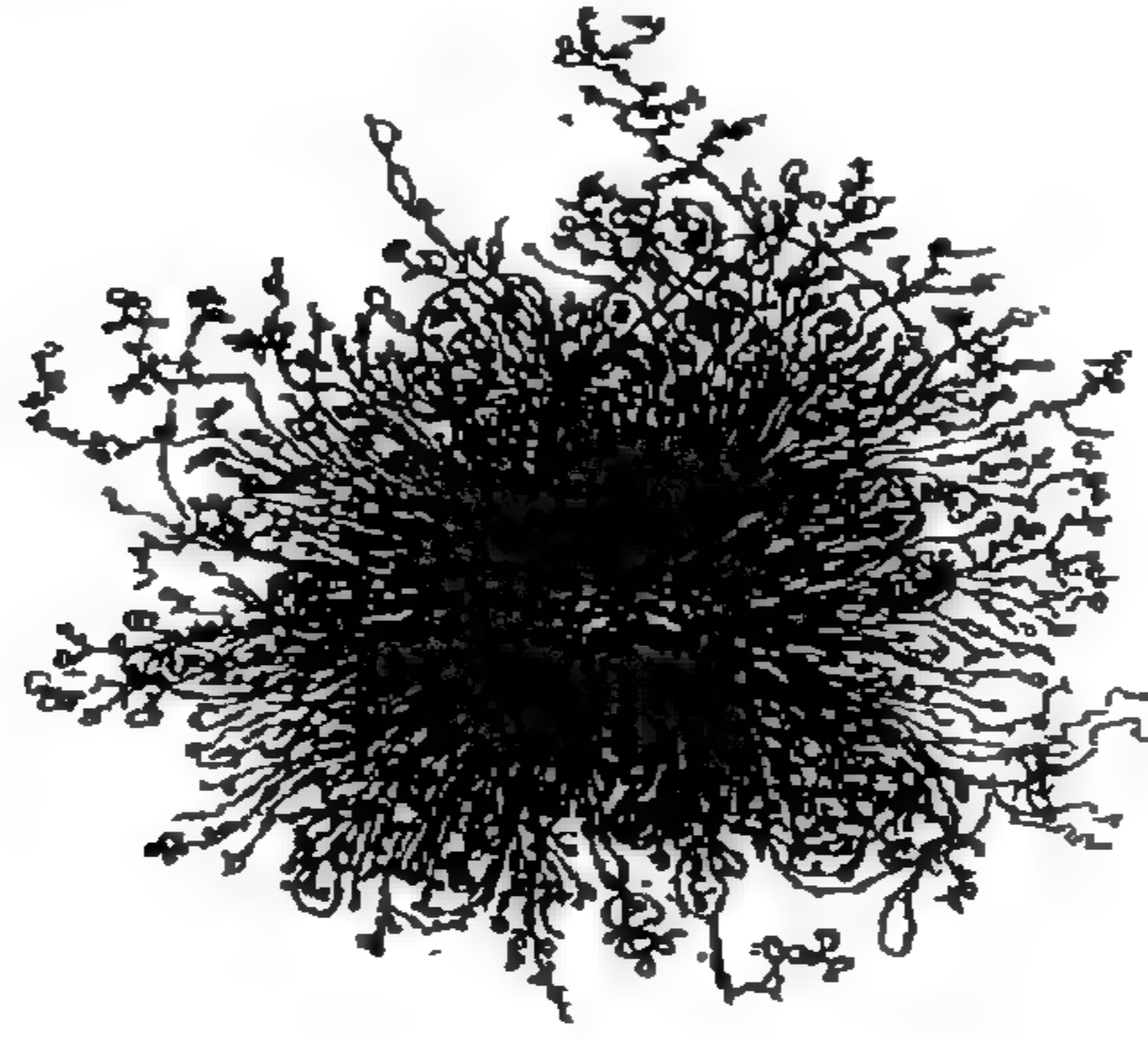
#### Bacterial Chromosome

كروموسوم البكتيريا إيشيريشيا كولاي *E. coli* والبكتيريا *Salmonella typhimurium* وغالبية البكتيريا الأخرى عبارة عن جزيء دنا حلقي ثنائي الخيط أى الشريط أى الحلزون ds DNA مفرد الحلزنة المتميزة *single supercoiled*. يتكون الكروموسوم في *E. coli* من حوالي  $4.7 \times 10^6$  زوج قواعد bp. وعند فرد هذا الكروموسوم يصل طوله إلى 1 مم ن الفورمة لدنا (Bform DNA) وذلك بالرغم من أن طول خلية البكتيريا يتراوح بين 1-2 ميكرومتر ولذلك فإن لابد من أن يصبح مكثف ومركز وذلك بأنطوانه على نفسه ألف مرة ليصبح ملائم لأن يوجد بداخل الخلية البكتيرية (شكل ١٢).



شكل ١٢ : مقارنة بين حجم خلية إ. كولاي ودنا إ. كولاي.

عند عزل دنا من خلية البكتيريا وبطريقة خاصة معينة وذلك لتفادي كسر دنا وأيضا تفادي دنترة أو فساد البروتين فإن دنا يكون موجود في شكل مندمج مكثف يسمى شبيه النواة nucleoid أو الجسم النووي nuclear body (شكل ١٤). يتكون شبيه النواة من جزيء دنا واحد وبروتين ورنـا. يمكن تصوير شبيه النواة بالمجهر الإلكتروني (شكل ١٣) ويتضح من الشكل خاصيتين أو ميزتين هامتين وهو أن دنا يتميز بوجود نتوءات عقدية كثيرة loops، أن كل نتوء عقدي زائد الحلزونية المتميزة supercoiled. تتكون شبيه النواة من جزء كثيف يبدو أنه جزيء دنا السابق وصفه وملتحم ومتواجد معه بروتينات ورنـا خاصة في المركز.



شكل ١٣: صورة بالمجهر الإلكتروني لكروموسوم البكتيريا إ. كولاى والذي يوضح عديد من النتوءات والعقد loops والتي تشتق من منطقة مركزية central region.

عند عمل قطع واحد فقط في خيط واحد فقط في جزيء دنا بواسطة إنزيم DNase يسبب إرتخاء وعدم وجود حالة الحلزنة المتميزة nonsupercoiled. حيث أن دنا العادى يتميز بحالة الحلزنة المتميزة كما سبق وصفه. وحيث أن القطع nick يسبب إرتخاء نتيجة للدوران الحر free rotation للطرف المقطوع. مع كل قطع فإن حلزنة متميزة واحدة تنفك أى مع القطع الواحد يفك نتوء عقده واحد فقط. يحتاج شبيه النواة إلى خمسون قطع قبل أن يصبح حلقة مفتوحة. معنى ذلك أن كل نتوء ذو حلزنة متميزة مستقلة. تركيب شبيه النواة الذى تم إستنتساخ تركيبه بهذه الطريقة يمكن توضيحه في الشكل (شكل ١٥).



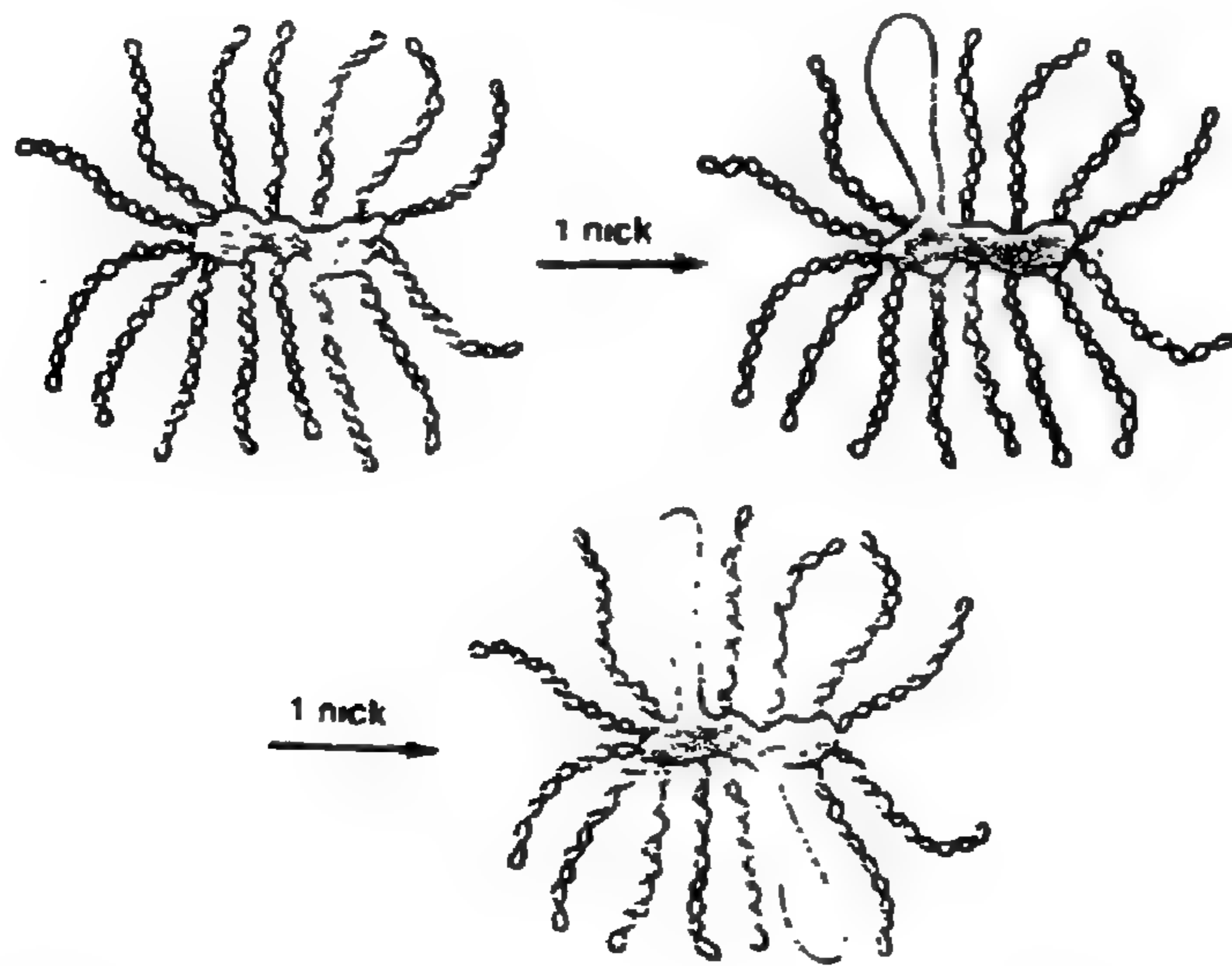
شكل ١٤ : خلايا البكتيريا بها شبه النواة nucloid.

نهاية كل نتوء عقدي ذات حلزنة زائدة تلتصق بالبروتين بطريقة معينة وتكون مستقلة عن نهايات الحلقات المجاورة حيث أن فك الحلقة الواحدة لا يؤثر على فك الحلقات المجاورة ولذلك يلزم قطع لكل نتوء عقدي loop فإذا تم عمل قطع واحد يحدث فك النتوء لعقده واحدة ولا يؤثر على فك العقد المجاورة ولذلك عند عمل قطع إضافي يحدث فك لنتوء عقدة ثانية وهكذا ينتج عن كل قطع فك نتوء عقدي. ومن ذلك يتضح أن تركيب شبيه النواة أن كل عقدة غير متصلة أو معزولة عن العقد الأخرى بطريقة معينة.

درجة الحلزنة المتميزة في دنا البكتيريا محكوم تماماً وثابت ولا يحدث إعتباطياً أي أن الحلزنة المتميزة تقع تحت تأثير خلية البكتيريا وهي صفة خاصة بالبكتيريا مثل الصفات الأخرى الخاصة بالبكتيريا. وجد أن الإنزيم دنا جيريز DNA gyrase والذي له دور مؤثر في عملية تخليق دنا هو المسئول أيضاً عن عملية الحلزنة المتميزة. يسبب إنزيم دنا جيريز حلزنة متميزة سالبة الالتفاف negative superhelical twists لجزيء دنا الحلقي المغلق covalently closed circular DNA. وجد أن المضاد الحيوي كومرميسين coumermycin يثبط إنزيم دنا جيريز الموجود بداخل البكتيريا *E. coli*. عند إضافة كومرميسين إلى مرزعة من بكتيريا *E.*



*coli* فإن الكروموسوم يفقد حالة الحلزنة المتميزة بسرعة. يوجد إنزيم عكسي لإنزيم دنا جيريز وهو إنزيم توبوأيزوميريز رقم ١ (topoisomerase-1) ووظيفته إزالة الحلزنة المتميزة. وفي حالة التجارب المعملية *in vitro* يمكن لهذا الإنزيم النقي أن يفك الحلزنة المتميزة لجزيء دنا. وجدت طفرات من البكتيريا ينقصها نشاط هذا الإنزيم وتسمى هذه الطفرات *top A*. وجد أن شبيه النواة في هذه الطفرات يحتوى على زيادة في الحلزنة وتصل الزيادة حوالى ٣٢% عن المعتاد. وهذه الطفرات يحدث لها طفرات ثانوية بسرعة عادة *secondary mutations* في الجينات الخاصة بإنزيم دنا جيريز، وهذه الطفرات تؤثر بدرجة بسيطة على نشاط إنزيم جيريز وبذلك تصبح درجة الحلزنة المتميزة في جزيء دنا عادية أى بالدرجة العادية. وجد من الدراسات العديدة أن إظهار تأثير الجين أى إظهار صفة الجين تتأثر بالحلزنة المتميزة. يوضح ذلك أن ثبات حالة الحلزنة المتميزة في خلية البكتيريا، وكما سبق القول أنها محكومة تماماً وثابتة تماماً، هامة لظهور صفات الجينات.



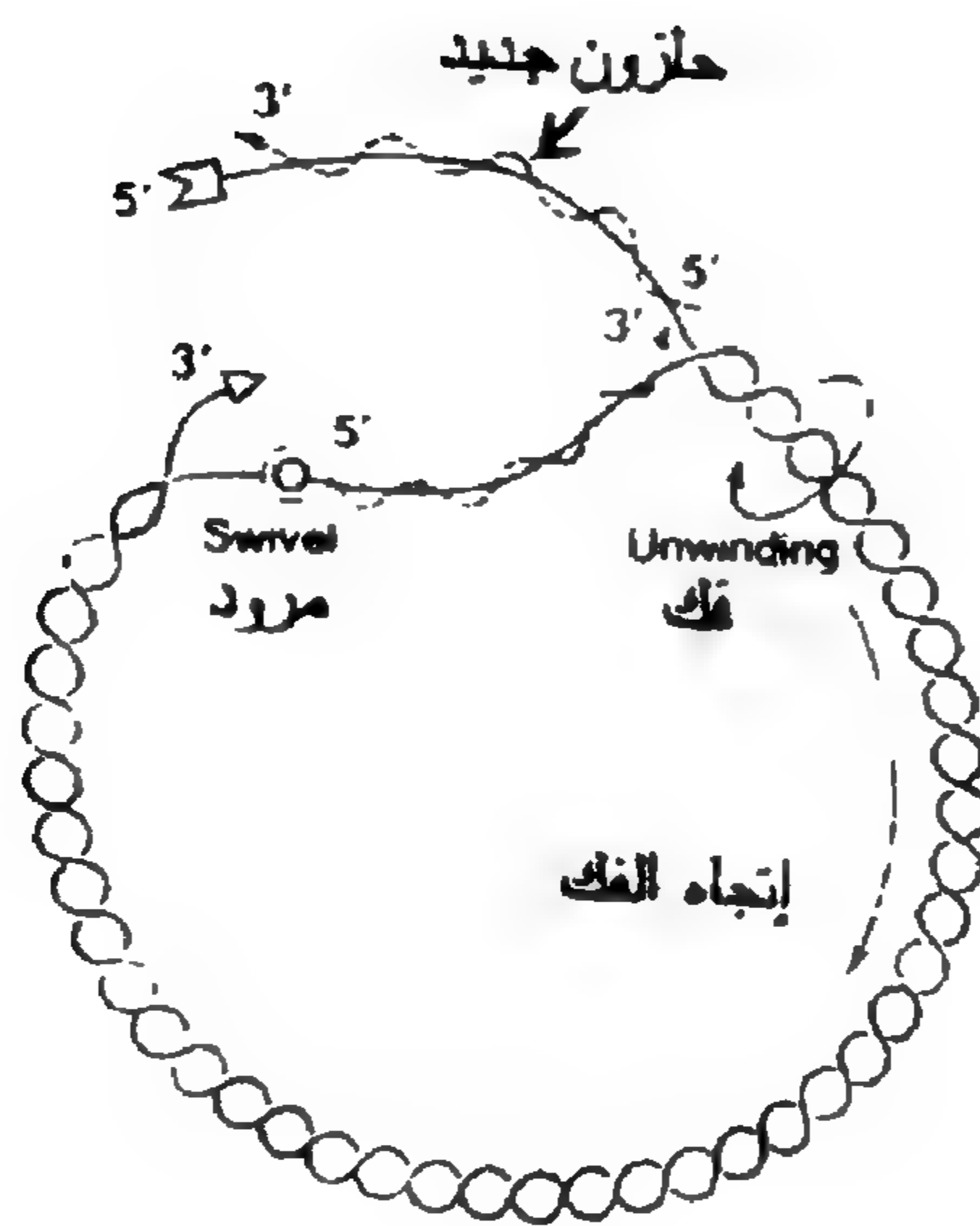
شكل ١٥: شكل تخطيطي للكروموسوم البكتيرى ذو التواءات العقدية الزائدة الحلزنة يوضح ١٥ نتوء عقدي زائد الحلزنة (المعتاد أن يوجد في الكروموسوم للبكتيريا). كولاى ٤٠-٥٠ نتوء عقدي زائد الحلزنة) ملتصقة بالبروتين (الجزء المركزى) بطريقة ما غير معروفة تماماً. يمكن فتح التواء العقدي الواحد الزائد الحلزنة بقطع واحد وهكذا الشكل به قطعتين وبالتالي به نتوين فقدا حالة اللولبة والحلزنة الزائدة.

أما عن طريقة إنقسام الكروموسوم البكتيرى فى البكتيريا *E. coli* فقد تمكن كيرنس Cairns عام ١٩٦٣ من وضع أسس إنقسام هذا الكروموسوم. حيث أن تضاعف الكروموسوم يبدأ عند منطقة معينة فى محيط الكروموسوم ثم يحدث فك لحزونى الكروموسوم تدريجياً حتى يتم تضاعف الكروموسوم تماماً. وملخص هذه العملية أنه يحدث كسر فى أحد حزونى DNA عند منطقة معينة تسمى منطقة البداية initiation site ثم يحدث فك لحزونى DNA تدريجياً وفى نفس الوقت يتضاعف DNA (شكل ١٦).

أثناء نمو المستعمرة البكتيرية أى أثناء أنقسام الخلايا تتفصل شبه الأنوية المنقسمة أى المادة النووية عن بعضها أى تبتعد عن بعضها. يلاحظ عدم وجود أى جهاز فى الخية البكتيرية مسئول عن ذلك وذلك بالمقارنة بخلايا النبات أو الحيوان العادية eukaryotes. حيث أن انفصال الكروموسوم فى خلايا النبات العادية أثناء الأنقسام يحدث نتيجة لأتصال سنترومير الكروموسوم ببعض خيوط المغزل وهى عبارة عن أنابيب صغيرة دقيقة microtubules ثم تنكمش هذه الخيوط أو الأنابيب فى اتجاه أحد قطبى الخلية وبذلك تبتعد الكروموسومات عن بعضها متحركة فى اتجاه أحد قطبى الخلية أثناء الطور الانفصالى. هذه الخيوط وهذه الأنابيب غير موجودة فى الخلية البكتيرية فكيف يحدث الانفصال بين الكروموسومين فى الخلية البكتيرية؟. وللإجابة على هذا السؤال وضع يعقوب وبرينر وكوزين Jacob و Brenner و Cuzin عام ١٩٦٣ نظرية التضاعف replicon hypothesis للكروموسوم البكتيرى (شكل ١٧) وهى كما يلى:

١ - عندما يبدأ تضاعف الكروموسوم البكتيرى فإن منطقة معينة specific site على محيط الكروموسوم ترتبط بمنطقة معينة على الميسوسوم mesosome تسمى منطقة التضاعف replicator site. يتكون الميسوسوم نتيجة لأنبعاج غشاء الخلية المبطن للجدار للداخل cell membrane كما أنه يتداخل مع بعضه مرات عديدة ليكون كتلة من الأغشية تسمى الميسوسوم. وفى منطقة

التضاعف تنشيط الإنزيمات المسؤولة عن كسر وتضاعف حلزوني DNA مثل إنزيم بلمرة الـ DNA polymerase. وفي هذه الأثناء ينكسر أحد حلزوني DNA عند الموقع 5' إلى 3' وتعمل منطقة التضاعف replicator site على فك حلزوني DNA مبتدئاً من مكان الكسر أو القطع ويزداد تدريجياً على طول الكروموسوم. تعمل منطقة التضاعف في هذه الحالة كمروود swivel.



شكل ١٦: تضاعف DNA حلقي، الخط العادي حلزون DNA قديم، الخط المتقطع حلزون DNA جديد.

٢ - بعد قطع أحد حلزوني DNA فإن أحد طرفي الحلزون المقطوع 5' يتصل بمنطقة تضاعف أخرى مجاورة لمنطقة التضاعف الأولى وذلك قبل حدوث تضاعف لحلزوني DNA. أي يحدث الالتحام بين الطرف المقطوع ومنطقة التضاعف قبل بدء حدوث التضاعف.

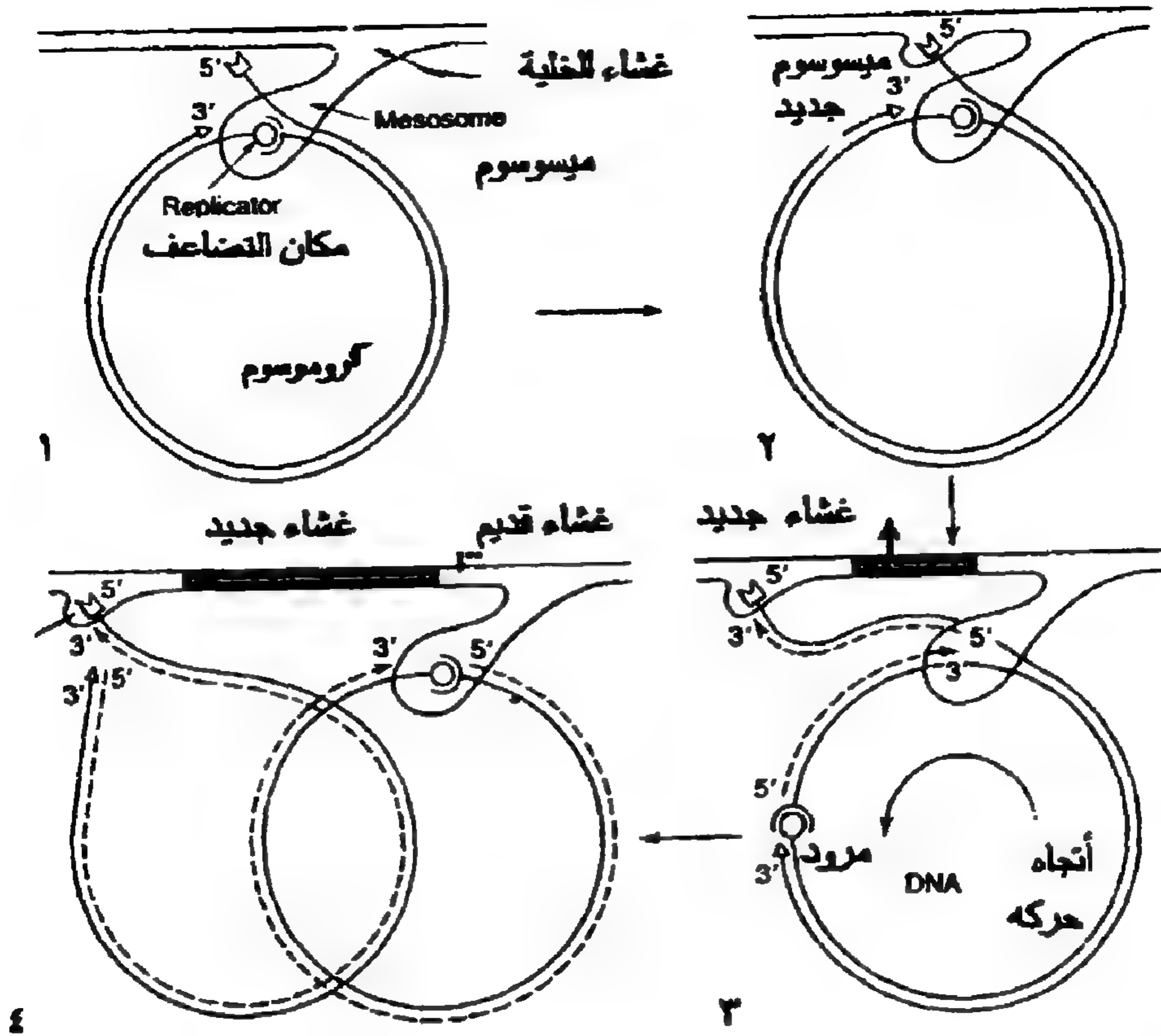
٣ - تحدث بداية فك حلزوني DNA في منطقة التضاعف. وأن التفاعل المسئول عن فك حلزوني DNA يبدأ من منطقة التضاعف وأيضاً الإنزيمات المسؤولة



عن تضاعف حلزوني DNA أثناء الانفصال تبدأ من منطقة التضاعف replication fork. وأثناء عملية فك وتضاعف DNA يتحرك الكروموسوم حركة دائرية في عكس اتجاه عقارب الساعة. وتتحرك أيضاً منطقة التضاعف والتي تعمل كمروود ويضاعف الكروموسوم.

٤ - ينفصل الكروموسومين عن بعضهما نتيجة لتخليق أجزاء في الغشاء بين موضع الالتصاق الأول وموضع الالتصاق الثاني الجديد. أى أن الغشاء يستطيل بين موضعى الالتصاق ويتباعد الكروموسومان الجديدان عن بعضهما.

أمكن إثبات كثير من خطوات هذه النظرية فيما بعد. حيث أمكن بواسطة المجهر الإلكتروني إثبات إلتصاق منطقة معينة على الكروموسوم بغشاء خلية البكتيريا. أمكن إثبات أيضاً وجود ارتباط كبير بين غشاء خلية البكتيريا و DNA المخلق الجديد وذلك بإستعمال DNA مشع حيث يتم تعليم الثيميدين tritiated thymidine. وجد أيضاً أن إنزيم بلمرة DNA أى DNA polymerase مرتبط بأغشية خلية البكتيريا.



شكل ١٧: تضاعف الكروموسوم البكتيري.

- ١ - إتصال الكروموسوم بغشاء الخلية ومكان التضاعف وكسر أحد حلزوني دنا.
- ٢ - إتصال أحد طرفي الحلزون المقطوع 5' بغشاء الخلية في منطقة ميسوسوم جديدة.
- ٣ - فك حلزوني دنا وحركة الكروموسوم في إتجاه عكس عقارب الساعة وبناء حلزونين جديدين. الحلزون القديم بخط عادي والحلزون الجديد بخط متقطع. كبر مساحة سطح الغشاء وهي منطقة غامقة.
- ٤ - تكوين كروموسومين جديدين مع كبر مساحة سطح الغشاء وبذلك تزداد المسافة بين الكروموسومين (منطقة غامقة).

## دراسة على الأحماض النووية

جميع الصفات أى المعلومات الوراثية hereditary information توجد فى الأحماض النووية. فى كثير من الكائنات الحية تتكون الجينات من أجزاء من دنا DNA ولكن فى قليل من الفاجات وبعض الفيروسات النباتية والحيوانية يعتبر رنا RNA هو المادة النووية للجينات.

### الدنترة ومنحنيات الإنصهار

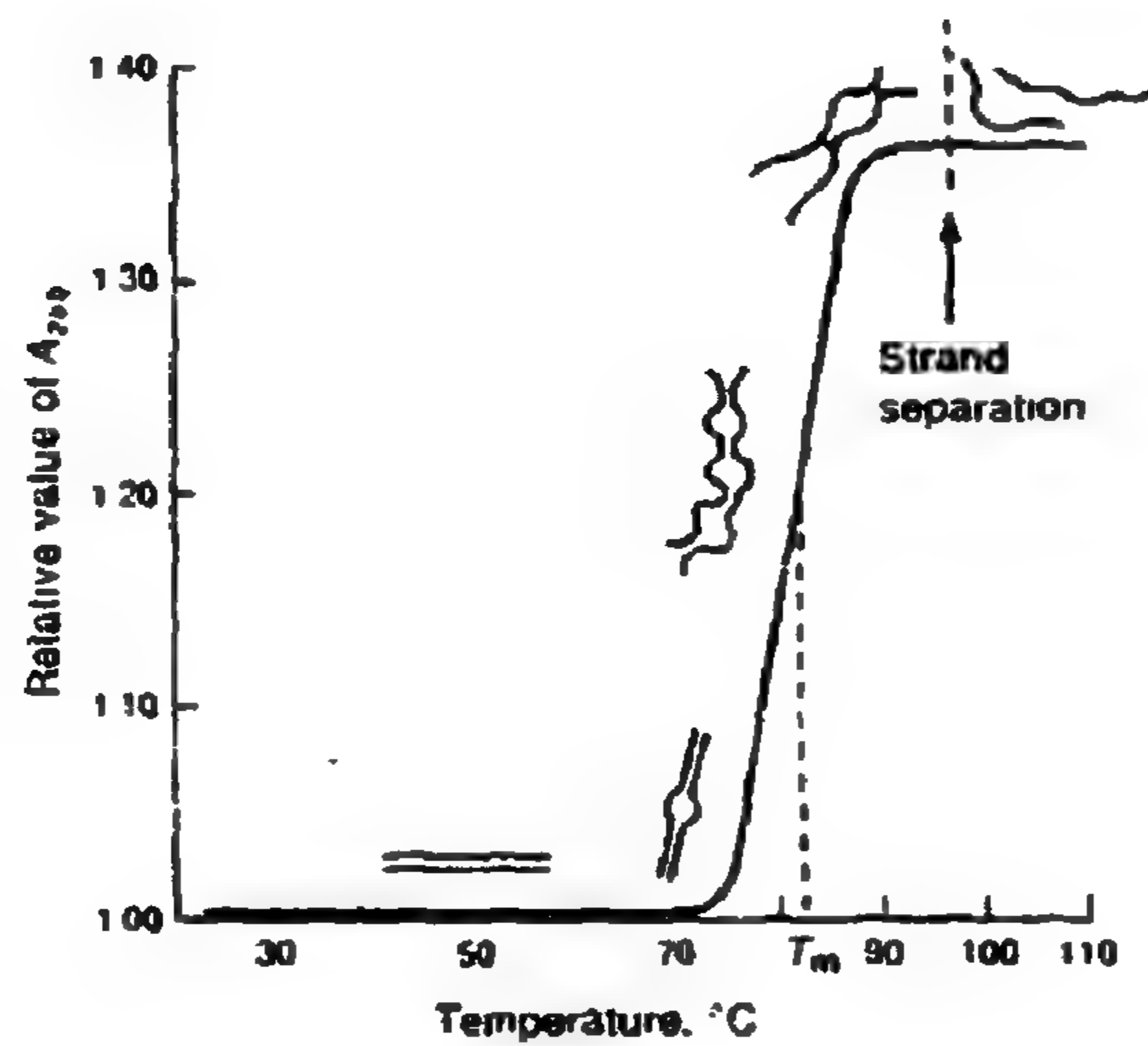
#### Denaturation and Melting Curves:

تعتبر الروابط الإيدروجينية التى تصل بين أزواج قواعد دنا DNA فى حلزونى دنا ضعيفة ومن السهل كسرها بالحرارة. عند كسر الروابط فإنه يحدث دنترة لدنا. دنترة ترجمة عربية لكلمة denatured. عندما تكون الروابط الإيدروجينية سليمة يسمى دنا عادى أو طبيعى native وهو عبارة عن دنا العادى الموجود فى الطبيعة والذى يتكون من حلزونى دنا. تسمى عملية التحول من الحالة العادية إلى حالة الدنترة بعملية الدنترة denaturation. عند تسخين دنا طبيعى وكسر الروابط الإيدروجينية فإن حلزونى دنا ينفصلان عن بعضهما ولذلك فإن دنا يصبح خيوط منفردة سائبة ويكون فى هذه الحالة مدنتر denatured DNA is single-stranded.

كثير من المعلومات عن تركيب دنا ودرجة ثابته أمكن التعرف عليها بواسطة عملية الدنترة ودراسة عملية الدنترة، ومن أمثلة ذلك أن دنا يمتص الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة ٢٦٠ نانومتر. وقد وجد أن الخيوط المنفردة من دنا تمتص الأشعة فوق البنفسجية عند هذا الطول بدرجة أشد من دنا الطبيعى. عند دراسة تأثير درجة الحرارة على دنترة دنا ورسم ذلك على منحنى يسمى هذا بمنحنى الإنصهار melting curve (شكل ١٨). عند بداية المنحنى يكون حلزونى دنا عاديين وبالتسخين ينفك حلزونى دنا تدريجياً نتيجة لكسر الروابط تدريجياً فكلما زادت درجة الحرارة كلما زاد فك حلزونى دنا وكسر عدد أكبر من الروابط. وعند درجة الحرارة



الدرجة critical temperature فيها يتم كسر آخر رابطة تربط الحلزونين عند قمة المنحنى وتصبح الخيوط شائبة ومتفصلة تماماً. تعريف درجة حرارة الإنصهار هو عبارة عن درجة الحرارة والتي يحدث عندها درجة الإمتصاص الكلية للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة ٢٦٠ نانومتر ( $A_{260}$  أى Absorbance). تسمى  $T_m$  درجة حرارة الإنصهار melting temperature تسمى التجارب السابقة بتجارب الإنصهار melting experiments. تتصل القاعدتين AT برابطتين إيدروجينيتين بينما تصل القاعدتين GC بثلاثة روابط إيدروجينية ولذلك فإن فصل القاعدتين GC يحتاج درجة حرارة أعلى عنه فى حالة فك القاعدتين AT. ولذلك فإن قيم  $T_m$  تتوقف على تركيب دنا. يلاحظ أن التسخين فى هذه التجارب تدريجى وهين.



شكل ١٨: منحنى الإنصهار لدنا يوضح قيمة  $T_m$  والتغيرات المختلفة فى الشكل لدنا فى درجات إنصهار مختلفة.

فى حالة المحاليل القياسية من حيث تركيز الأملاح ودرجة pH فإنه يمكن إستعمال  $T_m$  كمقياس لتركيب القواعد. فى درجة pH عالية فإن شحنة كثير من المجاميع المستعملة فى عمل الروابط الإيدروجينية تتغير وبذلك تمنع القواعد من تكوين الروابط الإيدروجينية وفى pH أكبر من ١١,٣ فإن جميع الروابط الإيدروجينية يحدث لها فك ويحدث لجزيئات دنا دنطرة كاملة. كما فى درجات الحرارة

العالية و pH متعادل فإنه يحدث كسر للروابط الفوسفورية ثنائية الإستر phosphodiester bonds والتي تصل بين السكر والقاعدة. وجد أن الرابطة الفوسفورية مقاومة تماماً للتحلل القلوي ولذلك فإن المعاملة على درجة pH عالية تسبب لك الحلزونين وأنفصالهما أى عملية الدنترة كسر الروابط التعاونية أى الروابط الفوسفورية ثنائية الإستر.

عند تبريد محلول دنا المدنتر بسرعة إلى درجة حرارة الغرفة أو عند تغيير pH محلول دنا المدنتر بواسطة القولية العالية من pH عال إلى pH متعادل فإن خيوط الحلزونات تستمر سائبة منفصلة. عندما يكون تركيز الملح فى المذيب منخفض فإن الشحنة السالبة لمجاميع الفوسفات تحافظ على الحلزونات شائبة منفصلة مستقيمة غير ملفوفة والعكس صحيح فى تركيز الملح المرتفع حيث يسبب معادلة للشحنات السالبة ولذلك فإن الحلزونات تصبح غير مستقيمة وتلتو وتلتف حلزونيات على نفسها لتكون جزيء مدمج compact نتيجة لتكون روابط بين قواعد حلزون دنا intrastrand base pairing.

وحيث أن تماثل تتابع القواعد فى حلزون دنا المتكون لا يكون طويل إلا فى حالات نادرة ولذلك فإن الأجزاء من دنا المتوافقة والمرتبطة ببعضها بواسطة روابط نادراً ما تزيد عن عشرة نيوكليوتيدات.

### **انعكاس الدنترة**

#### **Renaturation**

يمكن معاملة محلول من جزيئات دنا مدنتر بطريقة معينة بحيث أن جزيئات أى حلزونى دنا المنفصلة يعاد إتصالها وإرتباطها ليتكون جزيء دنا طبيعى عاد native مرة أخرى. تسمى هذه الطريقة annealing ويفضل تسميتها renaturation أو reannealing. تعتبر انعكاس الدنترة أداة هامة فى وراثه الكائنات الحية الدقيقة حيث أنها تستعمل بكثرة فى الهندسة الوراثية كمقياس لدرجة القرابة بين الكائنات الحية

الدقيقة كما أنها تستعمل أيضاً في هذا الصدد في النباتات الزهرية وذلك لإيجاد درجة القرابة بين البسلة والحمص والفاصوليا حيث وجد أن درجة القرابة بين البسلة والحمص أكبر منه بين درجة القرابة بين الحمص والفاصوليا وذلك في العائلة البقولية في العائلة النجيلية فقد وجد أن درجة القرابة بين القمح والرى أكبر من درجة القرابة بين الشعير والرى. تستعمل هذه الطريقة بكثرة في دراسات الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية. فهي بذلك تستخدم للتعرف على نوع معين من رنا RNA أو أنواع معينة من رنا وتستخدم أيضاً لتحديد تتابع قواعد معينة في جزيئ دنا. لكي تحدث حالة إنعكاس الدنترة لابد من وجود الشروط الآتية:

- ١ - يجب أن يكون تركيز الملح كبير بحيث أن الطرد أو التناثر الإلكتروستاتيكي electrostatic repulsion بين الفوسفات في الحلزونين يتوقف وعادة يكون تركيز الملح أي كلوريد الصوديوم يتراوح بين ٠.١٥ إلى ٠.٥ جزيئى.
- ٢ - أن تكون درجة الحرارة مرتفعة بدرجة كافية لكي يحدث فك الروابط الإيدروجينية في الحلزون والمذكورة سابقاً. ويجب أن تكون درجة الحرارة غير شديدة الإرتفاع لأن ذلك يمنع حدوث تكوين الروابط الإيدروجينية في الحلزون الواحد السابق ذكرها. درجة الحرارة المثلى لإنعكاس الدنترة هي أقل من ٢٠-٢٥ درجة عن  $T_m$ .

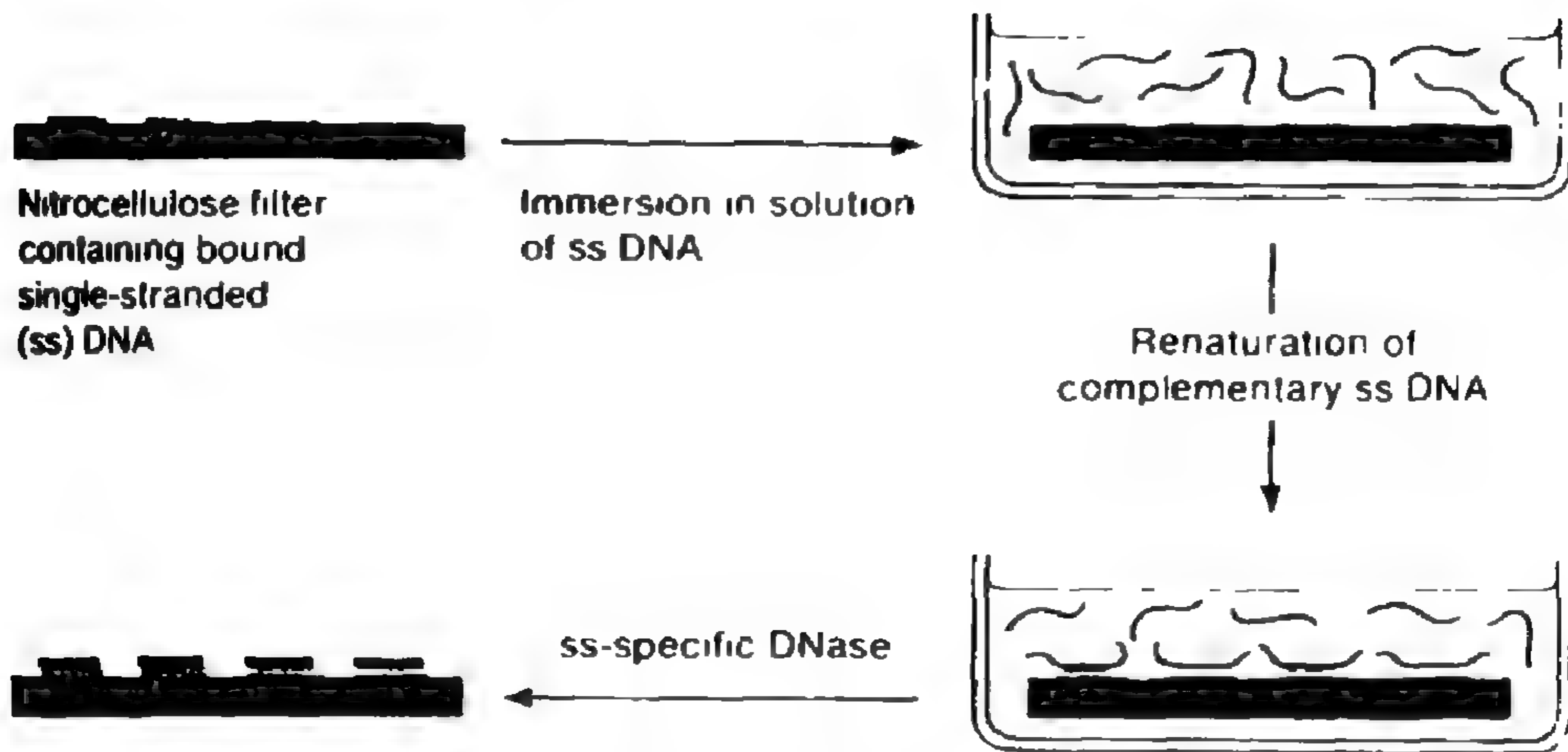
تعتبر حالة إنعكاس الدنترة بطيئة جداً بالنسبة للدنترة. حيث أن العامل المحدد لإنعكاس الدنترة ليس إنتفاف الحلزون (الذى يحدث بسرعة في ثوان) ولكن هو الإصطدام الدقيق بين جزيئات دنا المنفردة المكملة لبعضها بحيث أن تزاوج أى إرتباط القواعد يحدث في المكان الصحيح حيث أن الإصطدام الدقيق عشوائى نتيجة لحركة عشوائية فإنه معتمد على التركيز concentration dependent process. في حالة التركيزات المتبعة في المعامل والمناسبة لهذه الحالة فإن إنعكاس الدنترة يأخذ عدة ساعات. حدوث إنعكاس الدنترة يمكن ملاحظته وتقديره بواسطة الإنخفاض في إمتصاص دنا في المحلول للأشعة فوق بنفسجية.



## التهجين بواسطة الفلتر

### Filter Hybridization

توجد أنواع من المرشحات filters غشائية (membrane filters) مصنوعة من النيتروسيلليوز nitrocellulose. تتميز هذه المرشحات بأنها ذات قدرة كبيرة على ربط أو إلتصاق خيط دنا المفرد أى حلزون دنا المفرد ولكنها على العكس من ذلك غير قادرة على ربط أو إلتصاق دنا العاد المزدوج الحلزون أو حتى رنا بها. وهذه تعتبر طريقة هامة فعالة فى قياس درجة التهجين بين جزيئات دنا (شكل ١٩).



شكل (١٩): تهجين دنا على مرشحات غشائية من النيتروسيلليوز تحتوى دنا وحيد الشريط ثم الغمر فى محلول دنا وحيد الشريط ثم عكس الدنترة وفى الخطوة الأخيرة المعاملة بـ **Dnase** والذي يحلل دنا وحيد الشريط فقط ولا يحلل دنا ثنائى الحلزون.

وفى هذه الطريقة يتم ترشيح محلول دنا مدنتر. ترتبط الخيوط (الحلزونيات) السائبة المنفردة بشدة بالمرشح بواسطة العمود الفقري للجزيئ وهو السكر والفوسفات sugar- phosphate backbone ولكن تبقى القواعد حرة سائبة. بعد هذه المعاملة يوضع المرشح فى أنبوبة زجاجية صغيرة vial بها محلول كشاف أو جوهر كشاف reagent والذي يمنع إلتصاق إضافي لخيوط دنا السائبة أى يمنع إلتصاق كمية زائدة من خيوط دنا السائبة بالمرشح كما يضاف للأنبوبة كمية صغيرة من دنا مدنتر مشع. بعد فترة كافية لحدوث حالة إنعكاس الدنترة يتم غسيل المرشح. إذا

وجد على المرشح آثار للإشعاع دليل على حدوث حالة إنعكاس الدنترة والعكس صحيح.

تستخدم الطريقة السابقة للتعرف على درجة تماثل تتابع القواعد لكائنين مختلفين ومثال لذلك عند معاملة المرشح بدنا البكتيريا *Escherichia coli* ثم معاملته بدنا مدنتر مشع للبكتيريا *Salmonella typhimurium*. تعتبر كمية ودرجة تركيز الإشعاع على الفلتر - المرشح - كقياس حيث أنها تتناسب طردياً مع درجة توافق أجزاء دنا للبكتيريا الثانية مع البكتيريا الأولى. يدل على ذلك أن تتابع القواعد في دنا مفرد يماثله أى يكمله بدرجة عالية أو مناسبة من التكامل sufficient complementarity تتابع القواعد في جزيئ دنا آخر مفرد، ولذلك فإن هذا الإختبار يعطى فكرة عن درجة التماثل في تتابع القواعد في كائنين مختلفين degree of sequence similarity. هذه التجارب تستخدم بشدة في أبحاث التطور evolution ونظريات التطور evolutionary theory. كلما زاد التماثل في تتابع القواعد كلما كان ذلك دليلاً على درجة القرابة بين الكائنات المختلفة. تستخدم هذه في دراسة القرابة بين الكائنات الدقيقة وكما تستخدم أيضاً في الكائنات الراقية ومنها النباتات الزهرية ومن أمثلة ذلك العائلة البقولية والعائلة النجيلية كما سبق ذكره.

يمكن إستخدام هذه الطريقة أيضاً في التعرف على درجة تقارب أو توافق أو تماثل رنا لأجزاء من دنا. تسمى هذه الحالة التهجين بين دنا و رنا DNA-RNA hybridization وفي هذه الطريقة بعد إتصاق الشرائط (الحلزونات المفردة) لدنا بالفلتر فإنه يوضع في محلول يحتوى رنا مشع وبعد حدوث إنعكاس الدنترة فإنه يتم غسيل الفلتر - المرشح. يتم التعرف على درجة التهجين بين دنا و رنا بواسطة درجة تركيز الإشعاع على الفلتر بعد غسله وذلك بإستخدام عداد إشعاع مناسب مثل liquid scintillation counter.

يمكن إستخدام طريقة التهجين بواسطة الفلتر - المرشح - للتعرف على درجة التماثل في تتابع القواعد في قطعتين أى جزئين من دنا DNA segments. يتم عمل

ذلك بواسطة تغيير قيم pH وتركيز الملح ودرجة حرارة إنعكاس الدنترة. فى بعض الظروف الصارمة stringent conditions وهى التى تسمح بحدوث annealing فى حالة عندما يكون التوافق أى التكامل بين القواعد تقريباً تام ولكن فى حالة بعض الظروف الأقل صارمة less stringent conditions وهى التى تسمح بحدوث annealing عندما يكون التوافق بين القواعد غير تام أى جزئى.

### **إزدواج حلزوني دنا الغير متمثلين:**

#### **DNA Heteroduplexes**

يمكن استخدام إنعكاس الدنترة مع المجهر الإلكتروني وذلك لتحديد مناطق بها اختلاف فى تتابع القواعد أو مناطق فيها نقص فى تتابع القواعد أى أنها أقصر وذلك بالنسبة للشريط (الحلزون المفرد) المفرد الواحد من دنا. هذه الطريقة تسمى heteroduplex mapping أى خرائط إزدواج حلزوني دنا المفردين. وفى حالة استعمال ثلاثة أنواع من دنا أحدهما طويل والثانى بنفس الطول ولكنه يختلف عن السابق فى جزء معين حيث يختلف هذا الجزء فى ترتيب القواعد والثالث أقصر فى الطول. ثم يتم عمل دنتره لهذه الجزيئات من دنا وعند عمل عكس الدنترة للنوع الأول والثانى أى لخليط منها يمكن أن تتكون جزيئات عادية خليطة ولكن يحدث عند مكان الاختلاف أى الجزء الغير متوافق أى الغير مكمل لبعضه تباعد ويسمى هذا الجزء فقاعة bubble. وفى حالة عكس الدنترة بين النوع الثانى والنوع الثالث يتكون فى مكان الجزء الناقص عقدة loop (شكل ٢٠).

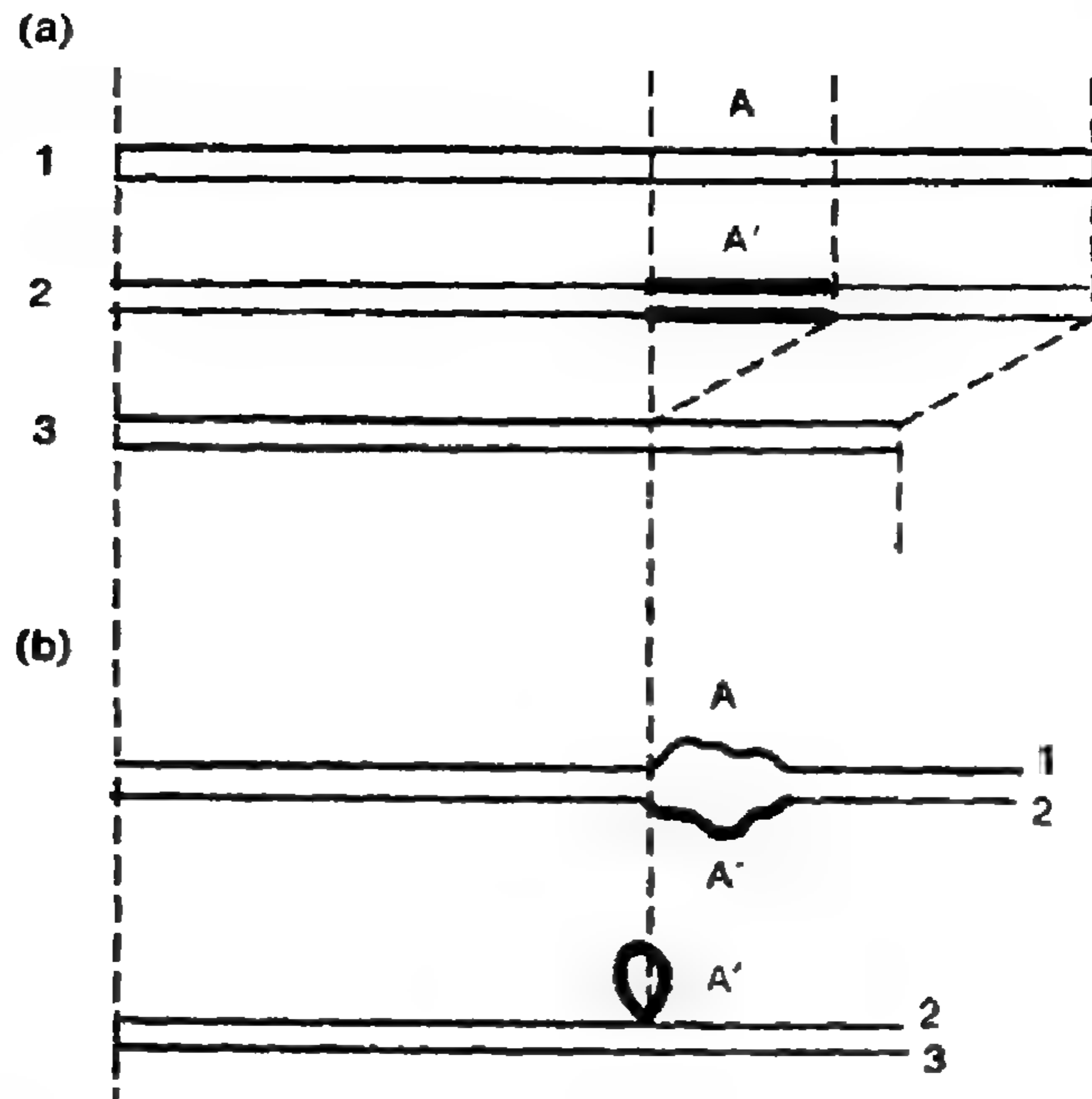
### **دنا الحلقي والزائد الحلزونية**

#### **Circular and Superhelical DNA**

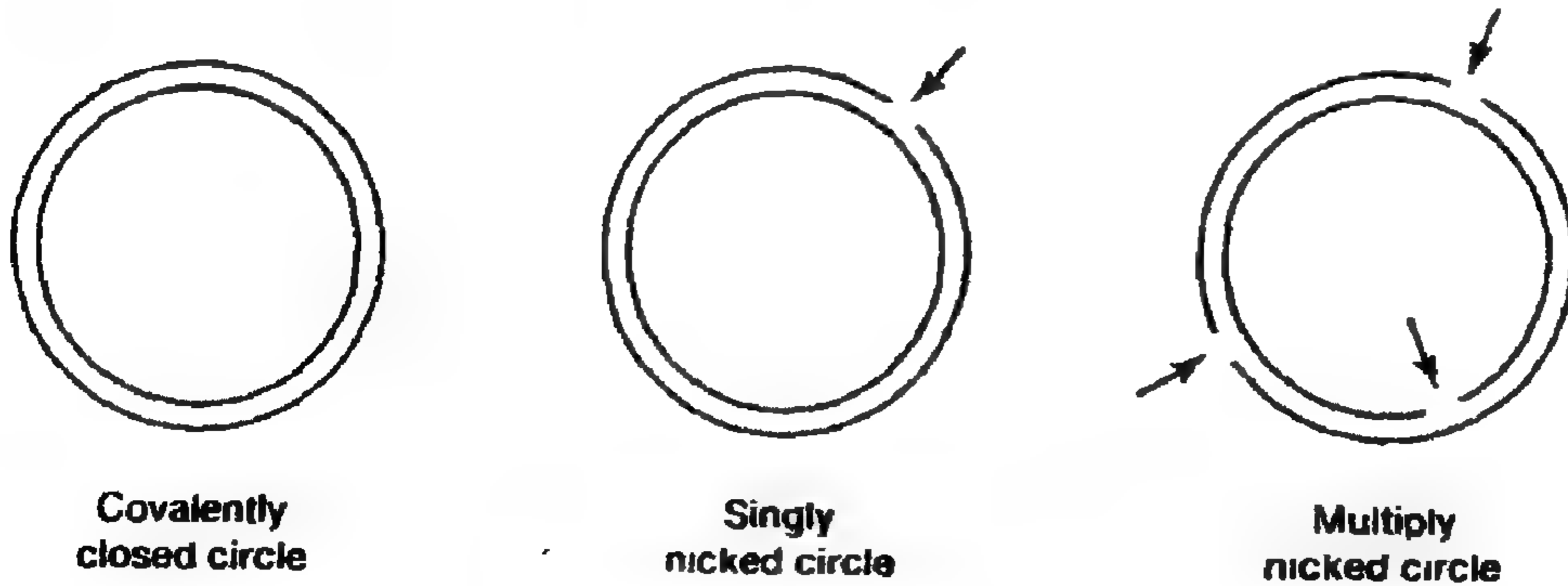
يعتبر الكروموسوم فى غالبية الكائنات بدائية النواة حلقي الشكل وأيضاً يكون حلقي الشكل فى البلازميدات. يمكن أن يكون الكروموسوم الحلقي (والذى يتكون من حلزونين دنا) مغلق تماماً ويسمى covalently closed circle أو يكون حلقة مفتوحة



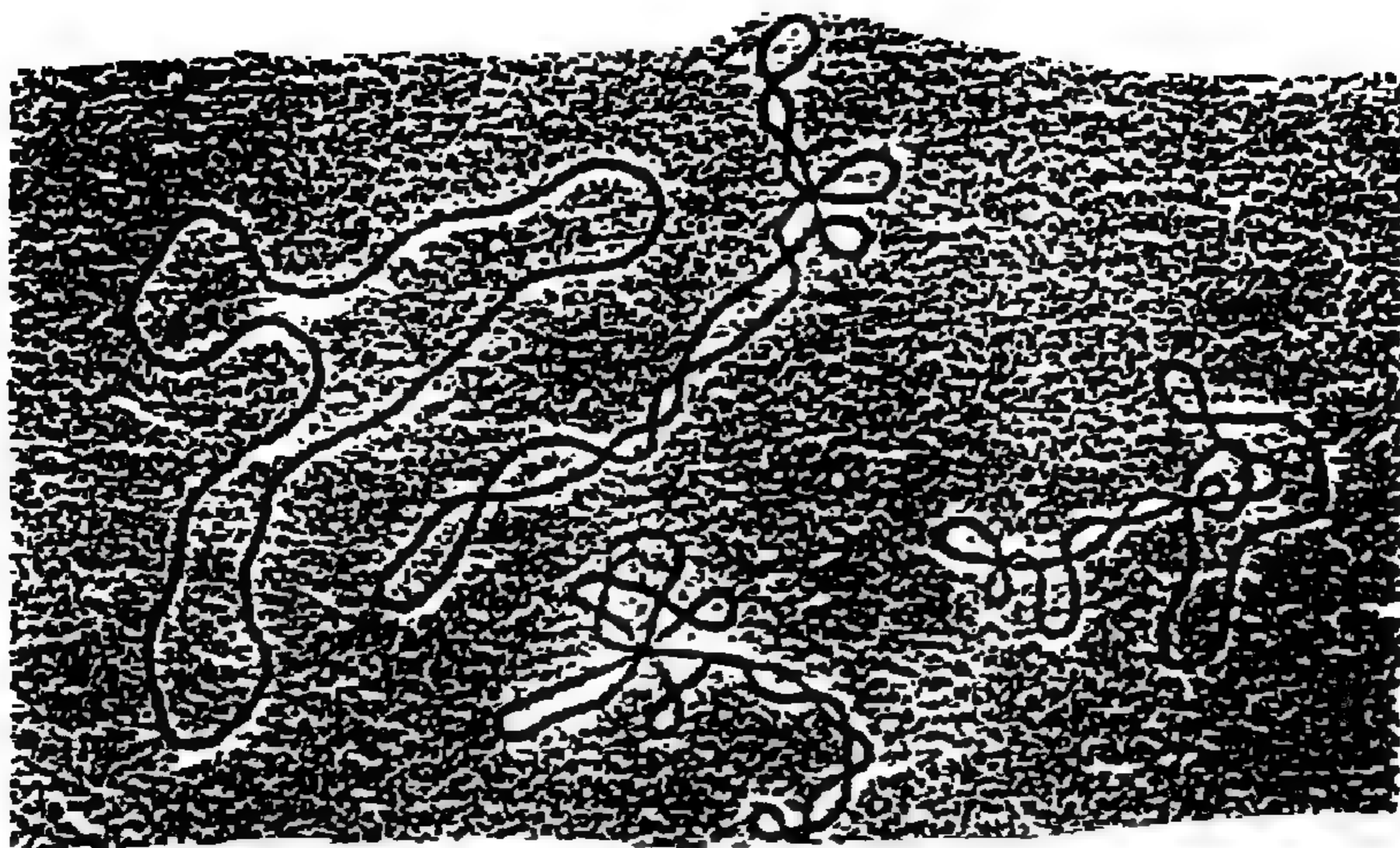
وذلك بقطع في مكان واحد وتسمى singly nicked circle أو يكون حلقة مفتوحة بأكثر من قطع أي اثنين أو ثلاثة إلخ وتسمى multiply nicked circle (شكل ٢١).



شكل ٢٠: ٣ جزيئات دنا ١، ٢ مختلفين في الجزء A، A' ورقم ناقص A، A'. الخطوط المتقطعة تعتبر مرجع لذلك. الشكل b به DNA heteroduplexes بين جزيئ دنا ١، ٢ ورقم ٢، ٣



شكل ٢١: covalently closed circle وهذه الحلقة بها قطع واحد وثلاثة أيضا. عادة يكون الكروموسوم الحلقي المغلق به حلزونه متميزة supercoiling أي متميز الحلزونية أو زائد الحلزونية. بتميز الحلزونية أو زائد الحلزونية ليس أن الحلزونية زائدة أو متضاعفة بل المقصود به أنه يوجد نوع أو طراز آخر من الحلزونية يحدث في الجزيئ (شكل ٢٢).



شكل ٢٢: جزيئات دنا متميزة (زائد) الحلزونية وجزئى nicked circular للفاج PM2.

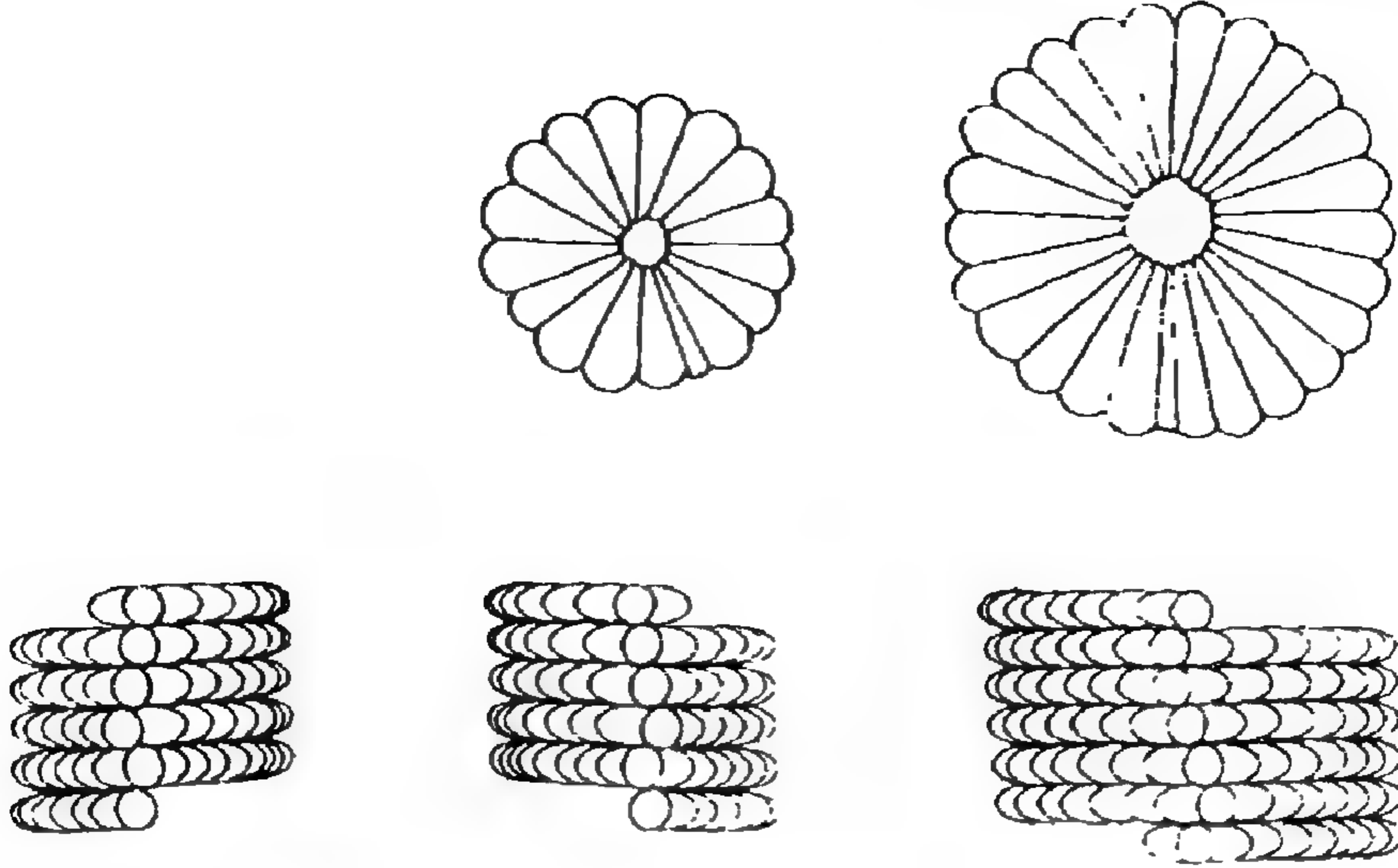
من الأهمية بمكان شرح ما هو المقصود بالحزون الموجب أى الحزون اليميني right- handed or positive coil والحزون السالب أى الحزون اليسارى left- handed or negative coil يعتبر الالتفاف الحزوني helical coiling إذا نظرت لمحور الحزون من أسفل helical axis فإذا كان الالتفاف فى اتجاه عقرب الساعة يسمى حزون موجب أو يمينى وإذا كان الالتفاف فى عكس اتجاه عقرب الساعة يسمى حزون يسارى أو سالب. جزئى دنا يعتبر حزون يمينى (شكل ٢٢).

يمكن أن يلتحم طرفى حزون دنا الشريطى بطريقة معينة لتتكون حلقة. وفى حالة الالتفاف أحد الطرفين للشريط الحزوني ٣٦٠ درجة بالنسبة للطرف الآخر ليسبب فك جزئى للحزون المزدوج ثم يلتحم الطرفين فإنه تتكون حلقة مغلقة من جزئى دنا تسمى underwound covalent closed circle أى الحلقة المغلقة المحولة أو المفكوكة جزئياً، وإذا أعيد تكوين الروابط الإيدروجينية، فإنها تلتف بطريقة عكسية فى عكس اتجاه الفك لتكون حلقة ملتفة معقودة لتخفيف الضغط على الحلقة وفى هذه الحالة تصبح الحلقة ذات عقدة واحدة معقودة لتخفيف الضغط على الحلقة وفى هذه الحالة تصبح الحلقة ذات عقدة واحدة node وتسمى أيضاً عبور واحد فقط

one crossing over وتأخذ الحلقة شكل ثمانية باللغة الإنجليزية 8. تسمى فى هذه الحالة الحلقة المغلقة ذات العقدة الواحدة أو الحلقة المغلقة ذات العبور الواحد. وفى حالة حدوث فك قبل الالتحام بمقدار ٧٢٠ درجة فإن ناتج تكوين الحلقة ضغط ثم فك للضغط أو تخفيف للضغط وذلك بالالتفاف فى عكس إتجاه الفك وذلك بتكوين عقدتين أى عبورين وتسمى الحلقة المغلقة ذات العقدتين أو الحلقة المغلقة ذات العبورين. وهكذا يمكن أن تتكون حلقة مغلقة ذات ثلاثة عقد أو أربعة عقد (شكل ٢٣) أو خمسة عقد وهكذا. أما عن سبب حدوث الالتفاف فى الإتجاه المعاكس twisting هو أنه فى حالة فك الحلزون ٧١٠ درجة فإنه يحدث كسر لعشرون زوج من القواعد حيث حدث فك للحلزون فى دورتين (لفتين للحلزون) حيث أنه فى حالة دنا الشريطى يوجد ١٠ أزواج من القواعد لكل دورة أى لكل لفه. لكى تستمر حالة الحلزون اليمينى أى الموجب مع وجود عشرة قواعد لكل لفه فإنه يحدث تغيير فى دنا بطريقة معينة بحيث أن الفك يتم تعويضه بالالتفاف حلزوني سالب أى يسارى Underwinding is rewound and compensated for by negative twisting (Left handed) of the circle.

عادة دنا الحلقي الموجود فى الطبيعى أى دنا الحلقي يكون مبدئياً مفكوك نسبياً underwound ولذلك فإنه يحدث له حلزونه زائده سالبة negative superhelics. درجة الالتفاف twisting تكون تقريباً واحدة لجميع جزيئات دنا الحلقيّة حيث أن الالتفاف واحد سالب negative twist ينتج لكل ٢٠٠ زوج من القواعد أى ٠,٠٥ twists لكل لفه من الحلزون. وفى حالة البكتيريا فإنه الفك الجزئى قبل حدوث الحلزونه المتميزة فى جزيء دنا لا يحدث نتيجة للفك الجزئى قبل الالتحام الجزيء ولكنه يتم عمله على الجزيء المتكون فعلاً بواسطة إنيم دنا جيريز DNA gyrase.





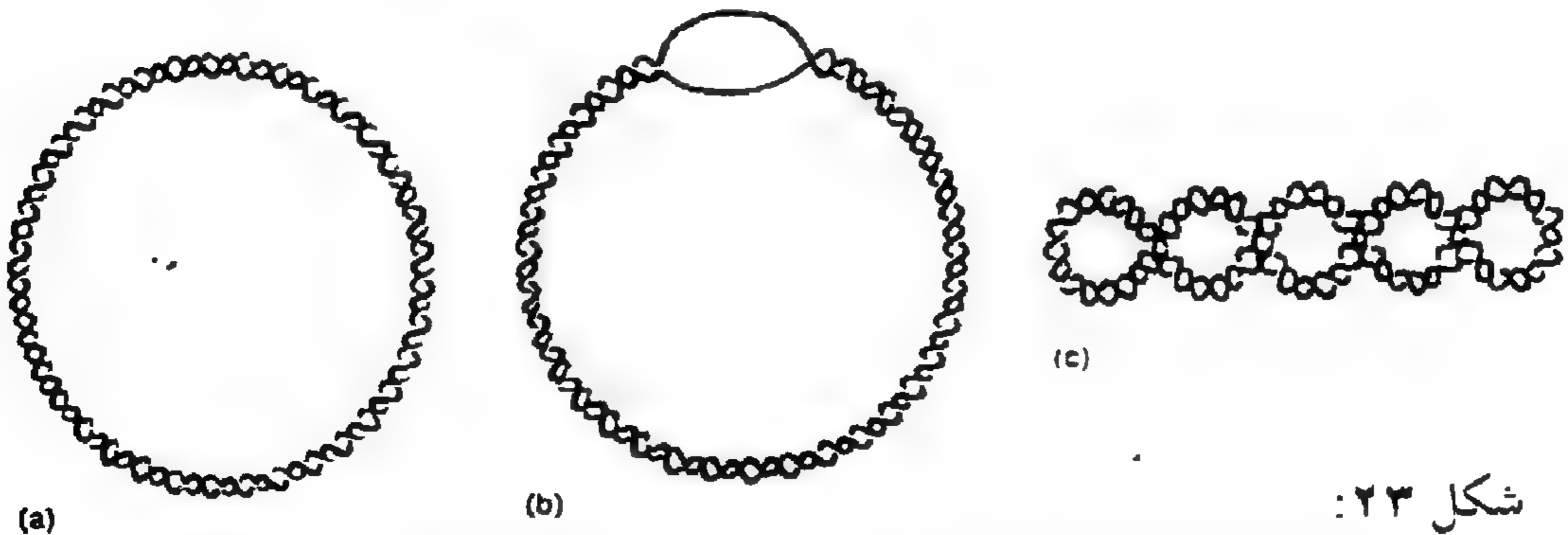
شكل ٢٢ رسم يوضح شكل سطحي (علوي) وأشكال جانبية (سفلى) لتوضيح إتجاه حلزون دنا مع إختصار كبير في طول الجزيء.

(a) فيروس تبرقش (موزايك) الدخان (التبغ) (Tobacco mosaic virus (TMV).

(b) فيروس خشخشة الدخان (التبغ) (Tobacco rattle virus (TRV).

كلا الحالتين السابقتين left handed helices

(c) يوضح TMV لو أنه في شكل عكسي أي right handed helices



شكل ٢٣:

a – Non-supercoiled covalent circle 36 turns of the helix (٣٦ لفه)

b – An underwound covalent circle having only 32 turns of the helix (bubble)

c – The molecule in part (b) but with four superhelical turns to eliminate under winding.

Note- In solution b and c would be in equilibrium. It would shift toward b with uncreasing temperature.

الجزئي في شكل c وله أربعة حلزونة متميزة لإزالة underwinding.

ملحوظة: في المحلول يكون b، c في إتزان وبزيادة درجة الحرارة يحدث إنتقال للحالة b.

## الأجزاء وحيدة الخيط في الحلزنة الزائدة:

### Single-Stranded Regions In Superhelices:

أتضح مما سبق أى نتيجة لوجود جزء مفكوك نسبياً فى جزيء دنا الحلقى فإنه يحدث ضغط على الجزيء ولتخفيف هذا الضغط نتيجة لوجود الفك الجزيء underwinding فإنه تحدث حلزنة متميزة سالبة. ولكن يمكن أن تحدث ثلاثة احتمالات أخرى لتخفيف الضغط نتيجة للفك الجزئى وهى:

١ - احتمال تغيير عدد أزواج القواعد فى كل لفة كاملة للحلزون. ولكن هذا نظرياً ولا يحدث إطلاقاً تبعاً لقوانين الديناميكا الحرارية.

٢ - يمكن أن يحدث الفك على هيئة فقاعة واحدة أو أكثر وتكون الفقاعة وحيدة الخيط (شكل ٢٣).

٣ - يمكن أن يكون تلافى الفك الجزئى جزئياً بواسطة الحلزنة المتميزة وجزئياً بواسطة الفقاقيع.

يتضح من ذلك أن جزيء دنا عبارة عن تركيب ديناميكي dynamic structure ويحدث له باستمرار فك جزئى إنتقالى أى مرحلى transient unwinding. عامة الضغط الناتج على الجزئى نتيجة للفك الجزيء يمكن تداركه بواسطة عدد وحجم الفقاقيع ومدتها وأيضاً بواسطة الحلزنة المتميزة. وفى حالة وجود جزيء دنا حلقى مغلق غير مفكوك جزئياً يمكن أن تحدث عملية التنفس breathing وهى عملية يحدث فيها كسر مرحلى أى إنتقالى transient breakage وإعادة تكوين الروابط الإيدروجينية. درجة حدوث الحلزنة المتميزة تختلف عند حدوث عملية التنفس.

## كيفية إثبات وجود الحلقات المغلقة معملياً:

### Experimental Detection of covalently Closed Circles:

يمكن أن يتكون دنا على هيئة حلقة مغلقة فى دورة حياة بعض الكائنات. يوجد أربعة طرق للتعرف على وجود هذه الأشكال أى التراكييب كما يأتى:

١- الترسيب في وسط قلوي مناسب للدنترة:

**Sedimentation at denaturing alkaline pH**

في درجة pH أعلى من ١١,٣ وفي محلول من ملح الطعام تركيزه ٠,٣ جزيئي تحدث دنتره لدنا العادي الخيطي وليست الحلقى ويتكون خيطين أي شريطين (حلزونين) منفصلين يرسبان أسرع من جزيء دنا العادي بدرجة ٣٠%. ولكن في حالة الحلقة المغلقة فإن الحلزونين لا انفصالان حيث أنه لا توجد لهما أطراف حرة أي منفصلة، ولذلك فإن الجزيء يندمج مع بعضه collapse in a tight tangle ويرسب بسرعة أكبر من سرعة رسوب دنا العادي ثلاثة مرات. في حالة وجود حلقة مغلقة ذات قطع واحد single nick فإنه يتكون جزيء حلقى مفرد وجزيء شريطي أي خيطي مفرد وترسب الحلقة أسرع من الشريطي الخيطي بدرجة ١٤% (شكل ٢٤ b).

٢- الطرد المركزي المتزن في محلول يحتوى على بروميد الإيثيديوم:

**Equilibrium Centrifugation in CsCl-containing Ethidium-Bromide**

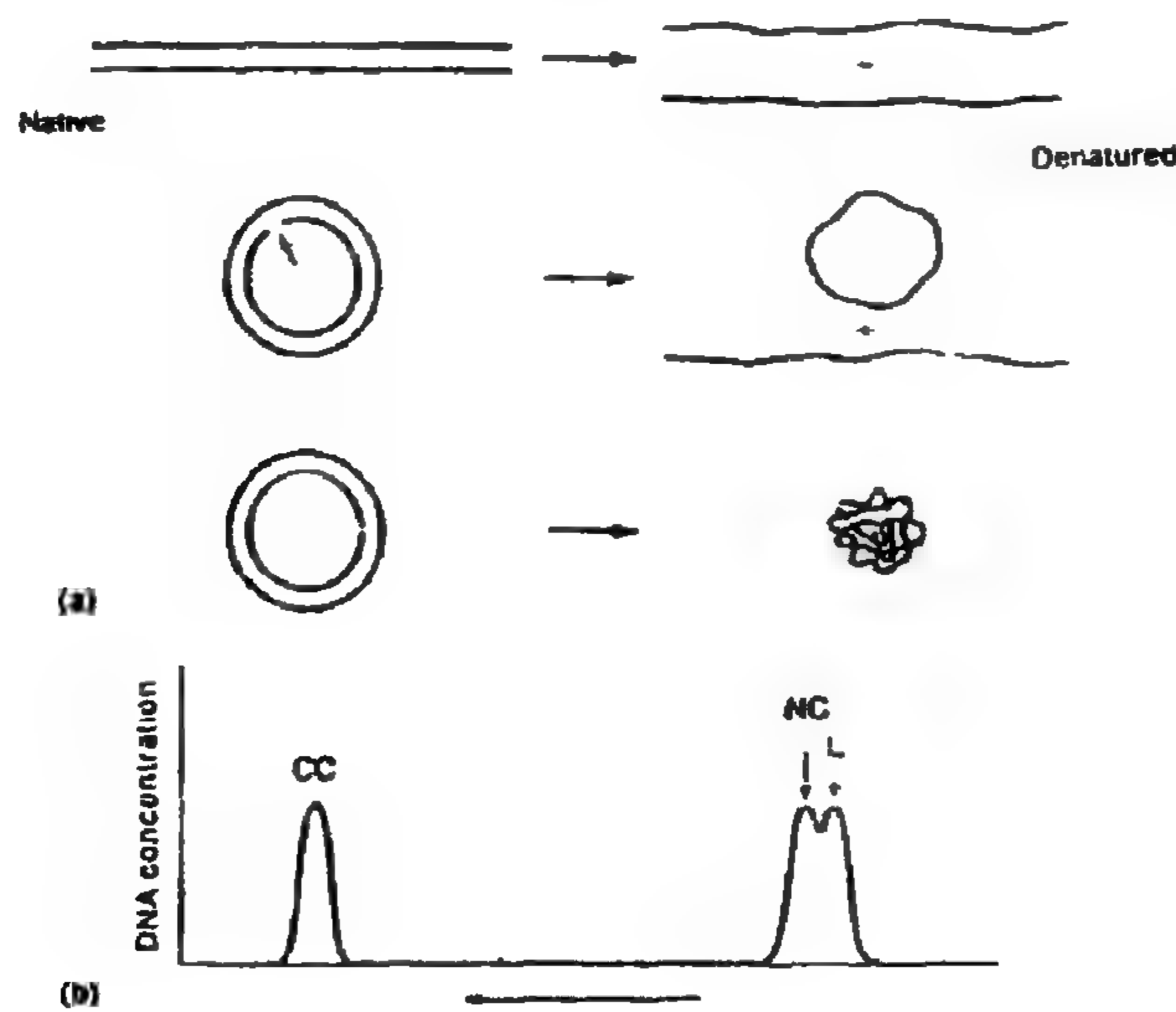
يمكن لصبغة بروميد الإيثيديوم (شكل ٢٥) أن تلتصق وترتبط بشده بجزيء دنا وبذلك تقلل من كثافته بدرجة ٠,١٥ جم/سم<sup>٣</sup>. أما عن طريقة الارتباط فهو دخول جزيء بروميد الإيثيديوم بين حلزوني دنا أن يتخلل intercalating بين أزواج القواعد في حلزوني دنا وبذلك تسبب فك حلزوني دنا وتزداد حالة الفك كلما زادت كمية جزيئات بروميد الإيثيديوم المرتبطة. وفي الحلقات المغلقة وحيث لا توجد أطراف حرة للحلقة فعند الفك يلتوى أي يلتف twist الجزيء كله في الاتجاه العكسي، تزداد درجة الالتفاف بزيادة عدد جزيئات بروميد الإيثيديوم المتداخلة في الجزيء. وفي النهاية لا يمكن لجزيء دنا الحلقى المغلق أن يلتف أكثر من ذلك أي يصل للنهاية العظمى للالتفاف ولذلك فإنه لا يمكن لجزيئات أخرى من بروميد أن تخلل الجزيء. والعكس صحيح في حالة الحلقة ذات القطع أو الكسر الواحد أو أكثر وأيضًا في حالة دنا الشريطي غير الحلقى العادي حيث أنه لا توجد ضغوط على الالتفاف العكسي للجزيء ولهذا يستمر الجزيء في أخذ جزيئات الصبغة باستمرار. كلما زادت كمية



الصبغة المرتبطة بدنا كلما قلت كثافة جزيء دنا وحيث أنه تبعاً للشرح السابق فإن كمية الصبغة المرتبطة بجزيء دنا في حالة دنا العادي الشريطي الغير حلقى أو دنا الحلقى ذو القطع الواحد أو الأكثر من قطع أو كسر تكون أكبر بكثير من كمية الصبغة المرتبطة بالحقلة المغلقة ولذلك فإن الحلقة المغلقة لها كثافة أكبر منه في الحالات الأخرى وذلك عند استخدام تركيزات مشبعة من جزيئات بروميد الإنيديم. نتيجة ذلك يمكن فصل الحلقات المغلقة عن الأنواع الأخرى بإستعمال الطرد المركزي المتزن equilibrium (شكل ٢٥). سيتم حالة شرح الطرد المركزي المتزن في جزء لاحق.

٣ - يمكن التعرف على الحلزنة المتميزة أي الحلزنة الزائدة بواسطة المجهر الإلكتروني (شكل ٢٢).

٤ - يمكن التعرف على الحلزنة المتميزة بواسطة agarose gel electrophoresis وسيتم شرحها في جزء لاحق في هذا الباب.



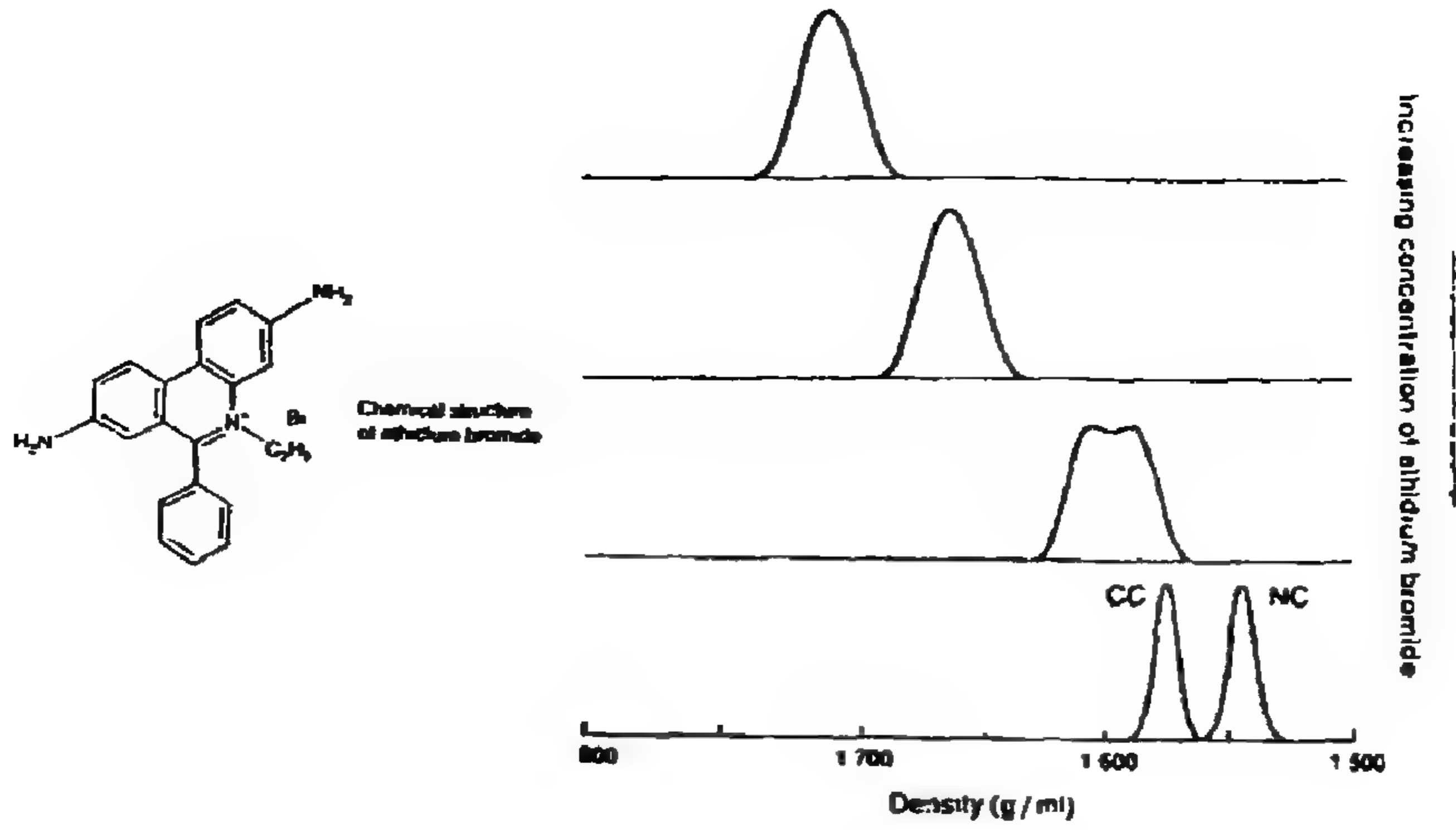
شكل ٢٤: نواتج دنتره أشكال مختلفة من دنا (a)

(b) فصل Covalently closed circles

(CC) nicked circles (NC)، وجزيئات

شريطية (L) linear بواسطة الترسيب بقلوى السهم يمثل طول أنبوبة الطرف المركزي.

الترسيب من اليمين إلى الشمال.



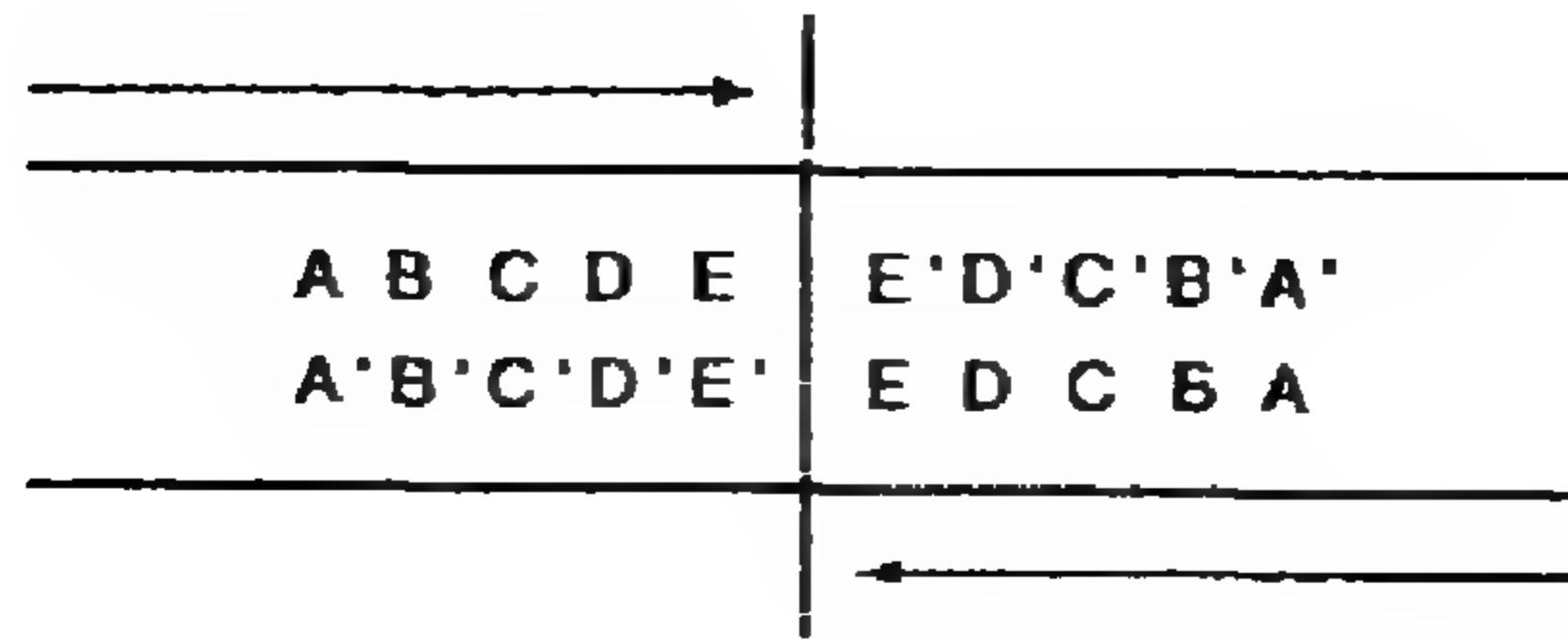
شكل ٢٥: التركيب الكيميائي لبروميد الإيثيديوم وتأثيره على كثافة دنا في محلول من كلوريد السيزيوم. مخلوط لكميات متساوية من Covalently closed circle (CC)، و nicked circle (NC). تم عمل طرد مركزي في محلول كلوريد السيزيوم محتوي على تركيزات مختلفة من بروميد الإيثيديوم تقل كثافة دنا تدريجيًا. ترتبط CC بكمية أقل من بروميد الإيثيديوم ولذلك فإنها ترسب عند كثافة أكبر.

### التركيبات ذات تتابع القواعد الخاصة:

#### Structural Consequences of Special Base Sequences:

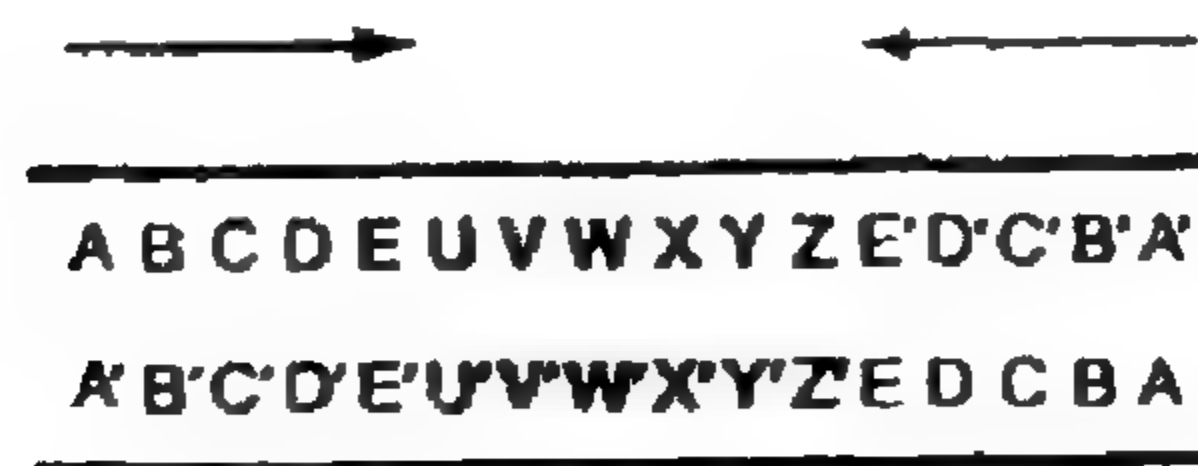
يوجد بعض حالات من تتابع القواعد تعتبر صفة فريدة للأحماض النووية. حيث يوجد تتابع للقواعد مكرر في بعض المناطق وبذلك يكون للأحماض النووية وحيدة الخيط وثنائية الخيط صفات خاصة وشكل خاص. وفي بعض أنواع تتابع القواعد وحيث تتبادل البيورينات والبيريميديونات ينتج عن ذلك منطقة حلزونية يسارية left-handed helical region في جزيء دنا.

أحد التركيبات الخاصة من حيث تتابع القواعد هو التركيب ذو القراءة العكسية palindrome. التركيب ذو القراءة العكسية هو عبارة عن تتابع للقواعد له شكل عام كما يأتي (شكل ٢٦).



شكل ٢٦ : Palindrome.

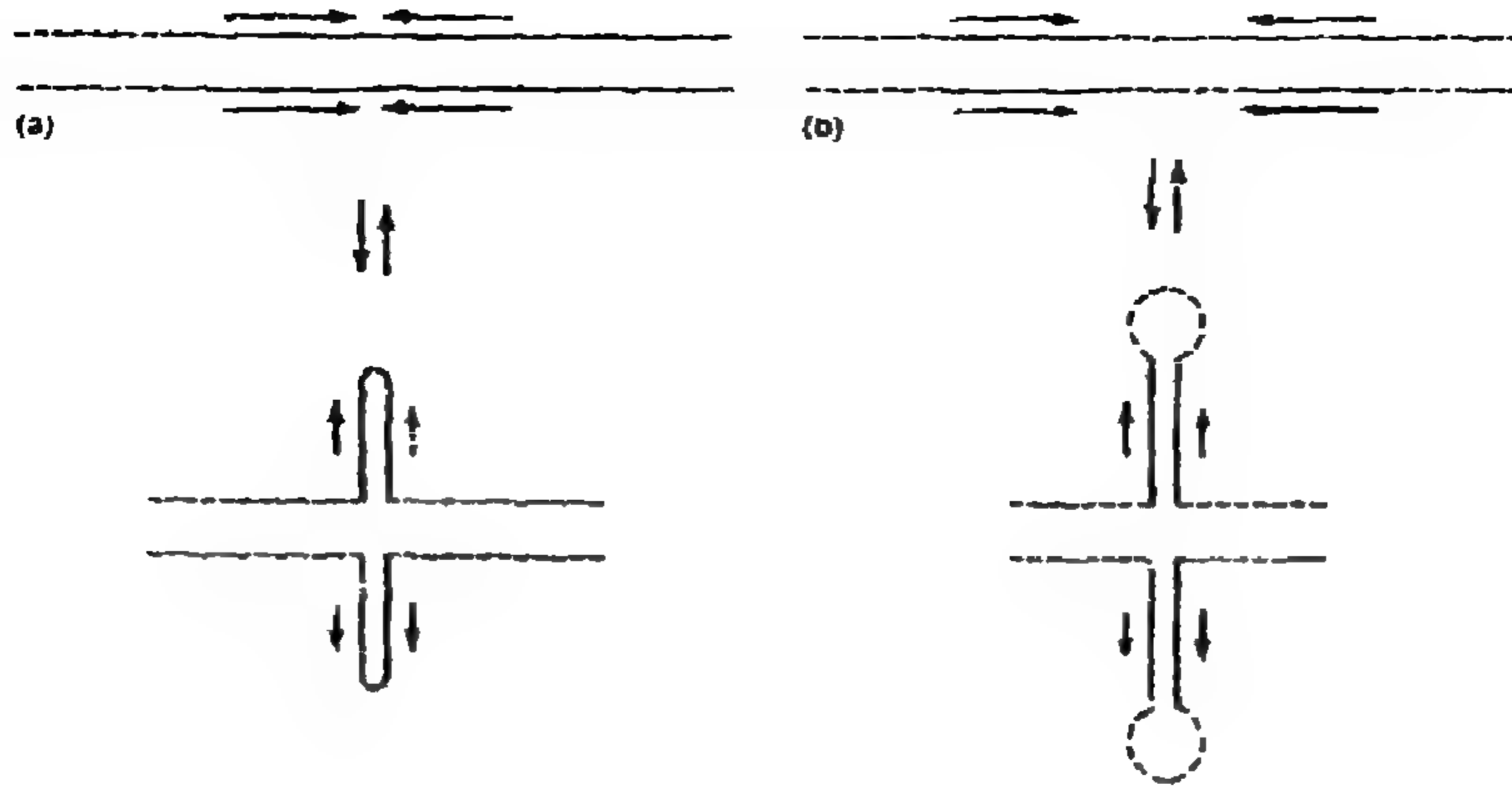
في الحالة السابقة نجد أن A، و A' وأيضا B، B' وأيضا C، و C' وأيضا D، D' وأيضا E و E' عبارة عن قواعد مكملة لبعضها ويمكن أن تتزاوج مع بعضها to pair ويعتبر الخط العمودي عبارة عن محور للتماثل an axis of symmetry ويمكن للجزء الثاني الحلزوني على يمين المحور أن يلتف عند المحور بزواوية مقدارها ١٨٠ درجة على مستوى الصفحة. ولذلك توجد مصطلحات خاصة أخرى يمكن أن تستعمل في حالة التراكيب ذات القراءة العكسية وهي الانقلاب المكرر inverted repeat أو منطقة التماثل الثنائي dyad symmetry. يتراوح طول التركيب ذو القراءة العكسية من عدد قليل من القواعد إلى حوالي خمسون قاعدة. يمكن أن يفصل القواعد الخاصة بالإنقلاب جزء عادي لا ينقلب ويسمى بالفاصل spacer (شكل ٢٧).



شكل ٢٧ . الفاصل Spacer.

في هذه الحالة يسمى بالإنقلاب المكرر inverted repeat. وحيث أن من المعروف أنه يمكن حدوث عملية التنفيس breathing في دنا فإنه يمكن أن يحدث تغيير في شكل جزيء دنا (شكل ٢٨) نتيجة الانقلاب المكرر والتنفيس.

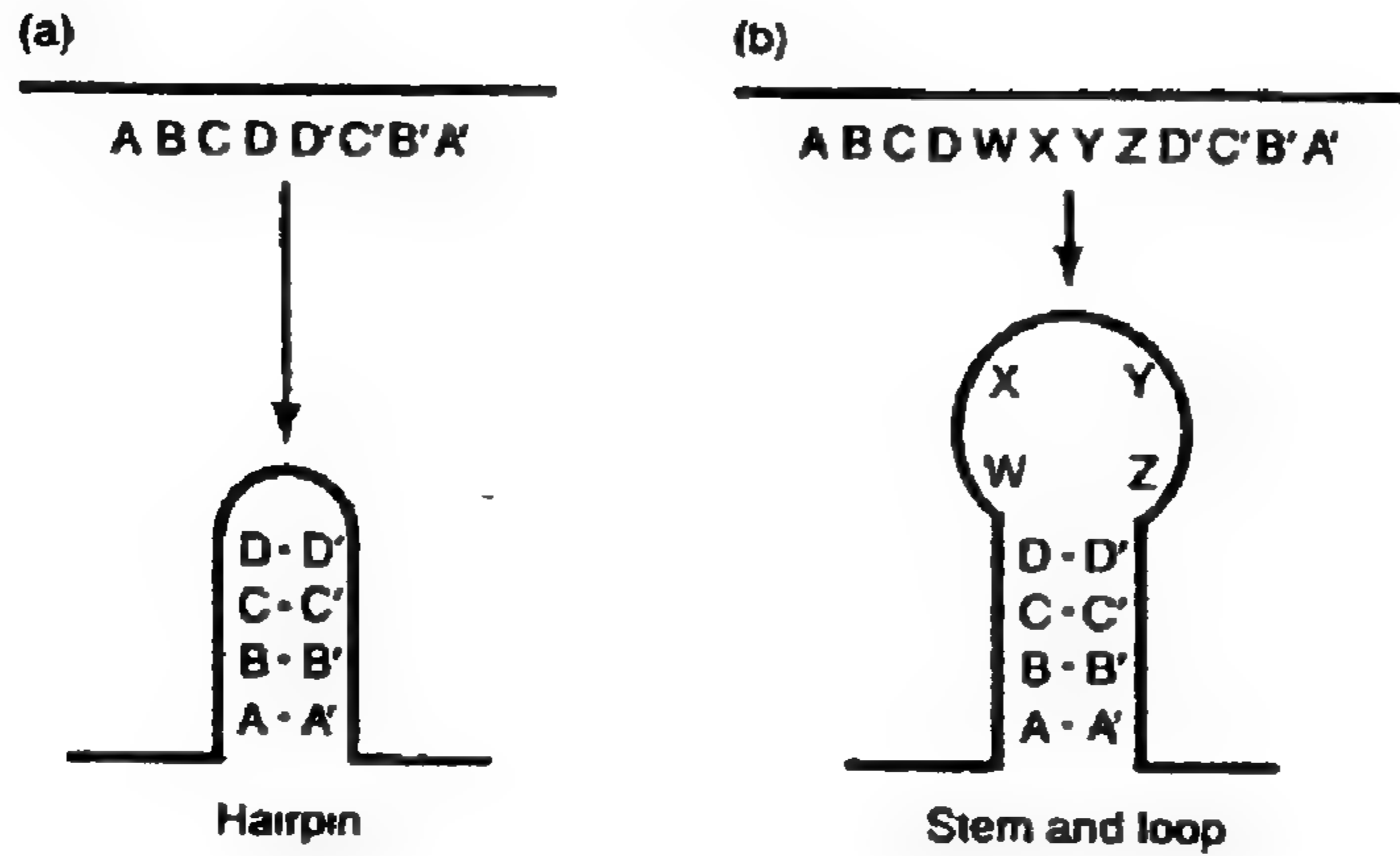




شكل ٢٨: تكوين الشكل الصليبي في دنا بتكوين 2 inverted repeats متصلين (a) أو بفصلهما الفاصل (b). الأسهم الأفقية تشير إلى إتجاه تابع القواعد orientation of the sequences.

عند انفصال الحلزونين المكملين لبعضهما فإنه يحدث ارتباط بين القواعد المتوافقة أي المتكاملة في الشريط الواحد أي الخيط الواحد أي الحلزون الواحد وينتج عن ذلك تكوين فرع جديد ثنائي الحلزون ds. يسمى الشكل الناتج بالشكل الصليبي cruciform (شكل ٢٨) تعتبر الأشكال الصليبية غير ثابتة نسبياً عند مقارنتها بالحلزونين العاديين الموجودين في جزيء دنا العادي لأنها تحتوى على عدد أقل من الروابط الإيدروجينية. يمكن إنتاج هذه الأشكال الصليبية في المعمل ولكنها لا تكون ثابتة في حالة دنا الموجود في الأنسجة الحية. وتعتبر التراكيب ذات القراءة العكسية palindromes والتراكيب ذات الانقلاب المكرر لهما تأثير جوهري على تركيب رنا وأيضاً دنا ss أي وحيد الحلزون الموجودة في بعض الفاجات. ومن المعروف أيضاً أن يمكن لدنا وحيد الحلزون ولرنا تكوين روابط إيدروجينية في الشريط الواحد أي الخيط الواحد أي الحلزون الواحد وذلك في حالة وجود قواعد متوافقة قريبة من بعضها. في هذه الحالة ينتج عن التركيب ذو القراءة العكسية جزء أي قطعة تكون ثنائية الحلزون في الحلزون الواحد وتسمى الدبوس الشعره hairpin (شكل ٢٩)

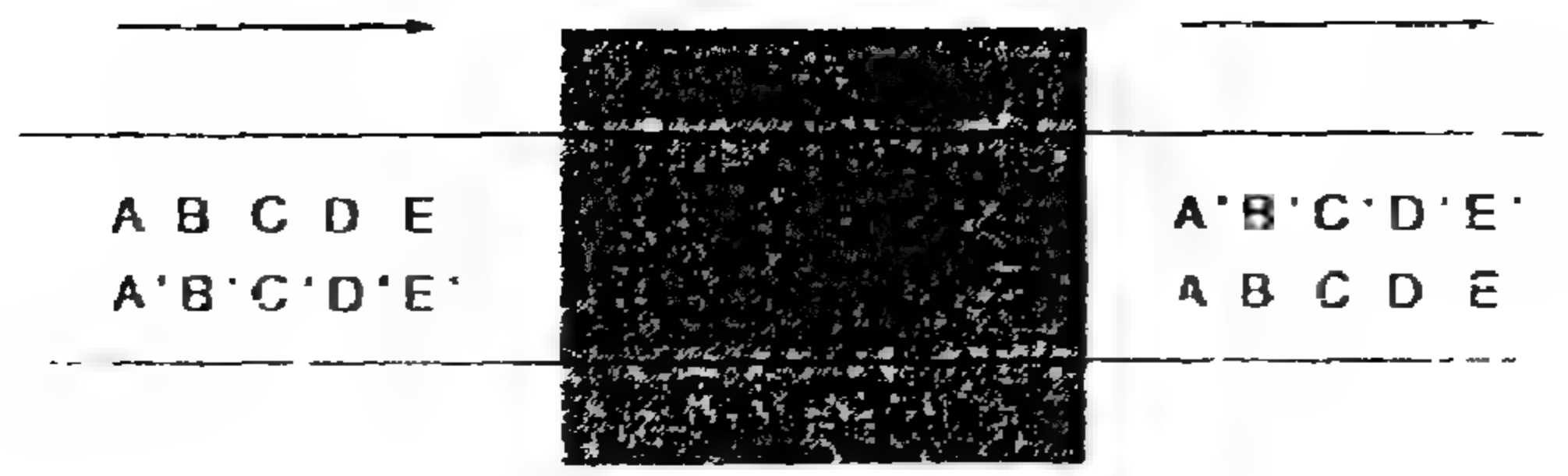
وفي حالة الانقلاب المكرر المتخلل interrupted inverted repeat ينتج جزء أى فرع ثنائى الخيط حيث أنه فى هذا الجزء يحدث إرتباط بين القواعد المتوافقة أى المكملة لبعضها بروابط إيدروجينية ولكن يوجد فى قمة الفرع حلقة وحيدة الخيط أى وحيدة الشريط أى وحيدة الحلزون terminal single-stranded loop وتسمى بإسم الساق والحلقة أو الساق والعقدة stem-and-loop (شكل ٢٩). هذه التراكيب الثانوية من خصائص خيط رنا المفرد.



شكل ٢٩: أشكال (a) hairpin، (b) stem and loop، والتي تتكون من نوعين من palindromes فى شريط مفرد واحد من دنا ss DNA.

الساق والحلقة أى الساق والعقدة له دور هام فى تنظيم تخليق رنا.

يمكن أن يحدث تتابع للقواعد معين ويحدث له تكرار أى يتكرر تتابع القواعد المعين فى نفس الإتجاه in the same orientation ويكون هذا التتابع مكرر بدون فاصل أو مع وجود قواعد فاصلة تسمى spacer كما سبق ذكره (شكل ٣٠) وتسمى هذه الحالة من تتابع القواعد فى نفس الإتجاه بإسم التكرار المباشر direct repeats وهذه الحالة لا ينتج عنها تكوين الأشكال السابق ذكره وهى دبوس الشعر أو الساق والحلقة أو غيرها فى حالة دنا ثنائى الحلزون وفى حالة رنا وحالة دنا وحيد الحلزون.



شكل ٣٠: تتابع القواعد في نفس الاتجاه في وجود فاصل.

### أنواع وتراكيب وأشكال الأحماض النووية:

تحتوي الخلايا العادية على تركيز من رنا أعلى من تركيز دنا عشرة أضعاف، وذلك باستثناء قليل من الفيروسات التي تصيب الكائنات ذات النواة الحقيقية وأيضا بعض الفاجات رنا RNA phages. وفي حالة الفيروسات قد يوجد رنا على هيئة خيط مفرد ويسمى رنا وحيد الخيط (single stranded RNA (ssRNA كما في فيروس تبرقش التبغ TMV أو يكون ثنائي الخيط (ds RNA) double stranded RNA كما في فيروس تقزم الأرز RDV أو يكون دنا ثنائي الخيط (ds DNA) double stranded DNA كما في فيروس تبرقش القنب CaMV أو يكون دنا أحادي الخيط (ssDNA) كما في فيروس التبرقش الذهبي في الفاصوليا bean golden mosaic virus.

لكن في المعتاد في الكائنات الحية يوجد رنا على هيئة خيط مفرد عديد النيوكليوتيدات single-standed polynucleotide. ففي الكائنات الحية يوجد ثلاثة أنواع من رنا وهي رنا الريبوسومي ribosomal RNA و رنا الناقل (tRNA) transfer RNA و رنا الرسول mRNA.

ففي حالة البكتيريا مثلاً يوجد ثلاثة أنواع من رنا الريبوسومي وحوالي خمسون نوع مختلفة من رنا الناقل وأنواع كثيرة من رنا الرسول تماثل في عددها تقريباً عدد الجينات وجميع هذه الجزيئات من رنا تشابه في مظهرها دنا وحيد الحلزون من حيث أنها مناطق وحيدة الحلزون يتخللها مناطق ثنائية الحلزون. عامة يتراوح بين إلى  $\frac{1}{2}$  إلى  $\frac{1}{3}$  من القواعد تكون مزدوجة أي متزاوجة أي مرتبطة paired. في حالة دنا وحيد الحلزون يكون الإزدواج أي التزاوج بين القواعد المتوافقة والمكملة لبعضها يكون في مناطق كثيرة قصيرة كل منطقة تتكون من ستة أو أقل من أزواج



القواعد. وحيث أن إزدواج القواعد في الحلزون المفرد لدينا يكون في مناطق قصيرة جداً لعدد قليل من القواعد والذي يحدث بالصدفة في أى مكان من حلزون دنا. ولذلك إذا تم عمل عملية دنتره لجزيء ثم بعد ذلك ترك لحدوث عملية إزدواج القواعد وتكوين روابط إيدروجينية فإن نظام حدوث إزدواج للقواعد وشكله يختلف من جزيء إلى آخر. والعكس صحيح تماماً في جزيء رنا وحيد الشريط فإن المناطق المزدوجة من الشريط تتكون من أعداد كبيرة من القواعد قد يصل إلى خمسون زوج من القواعد المتزاوجي أى المكملة لبعضها أى المرتبطة مع بعضها، وأيضاً لكل جزيء رنا معين نظام معين ثابت للإزدواج خاص بكل جزيء معين.

### **إنزيمات النيوكليينز:**

#### **Nucleases:**

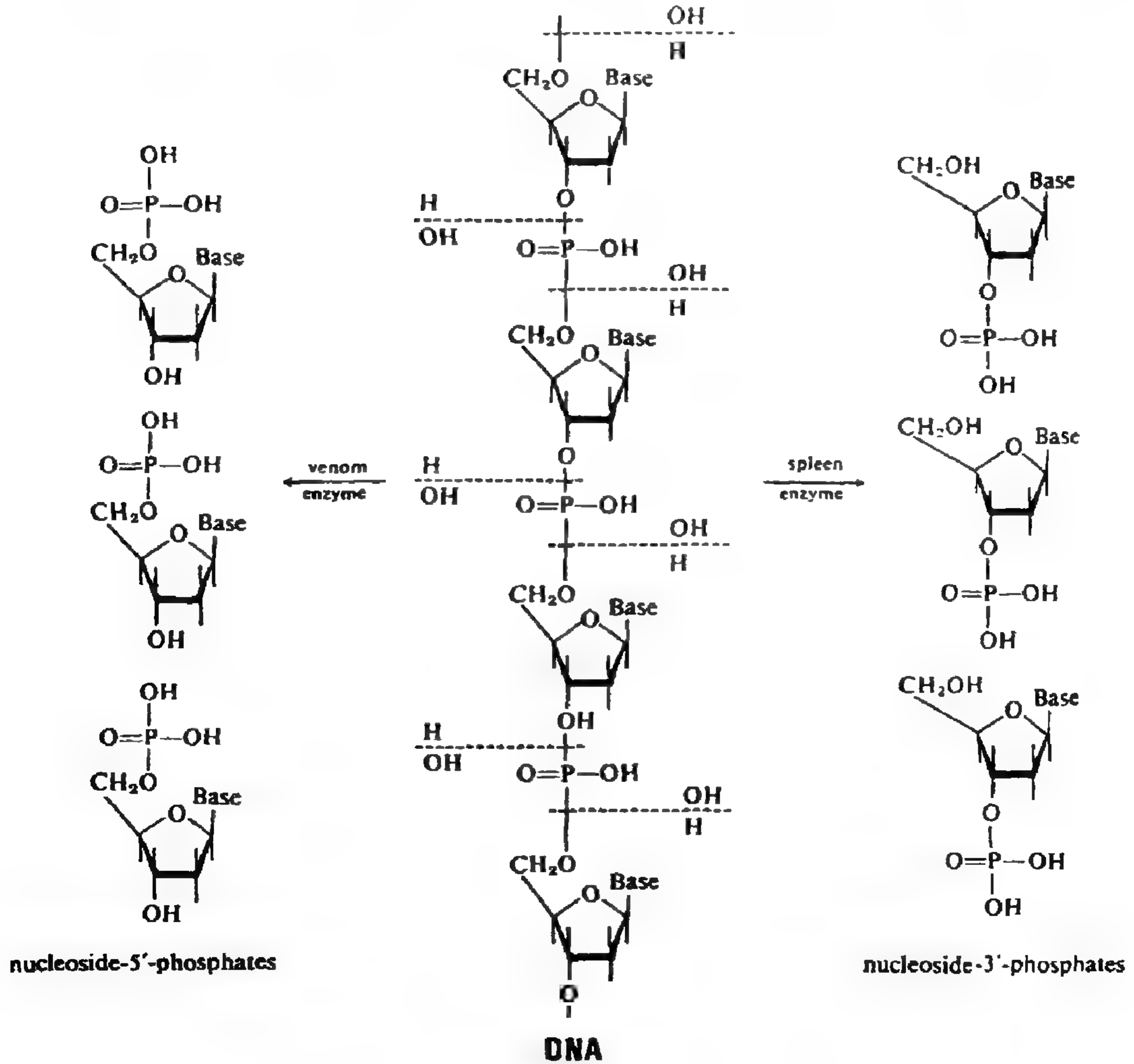
يمكن هدم وتحليل DNA، RNA إلى نيوكليوتيدات منفردة حرة أو جزيئات ذات عدد قليل من النيوكليوتيدات كيميائياً أو إنزيمياً. وعلى سبيل المثال أنه عند pH رقم ١ فإن الروابط الفوسفورية ثنائية الأستر والروابط الجليكوسيدية N-glycosidic bond بين القواعد والسكر تنكسر وينتج قواعد حرة.

تسبب إنزيمات النيوكليينز فصل أو تحليل أو تكسر أو هدم الأحماض النووية. غالبية هذه الإنزيمات لها تخصص كيميائى واضح حيث أن بعض منها متخصص في هدم DNA ويسمى دى أوكسى ريبونيوكليينز (Dnase) والبعض الآخر متخصص في هدم RNA ويسمى ريبونيوكليينز (RNase) ribonuclease. ويزداد التخصص عن ذلك حيث أن بعض DNases تعمل على ssDNA فقط وأخرى تعمل على dsDNA فقط ولكن يوجد بعض منها يعمل على النوعين أى على ss DNA و ds DNA. يوجد أيضاً نوع آخر من التخصص حيث أن بعض منها تحلل الجزيء مبتدئة من أحد طرفى الجزيء ومتجهة إلى الداخل وهذه تسمى بالنيوكلييزات الخارجية أى الطرفية exonucleases وينتج عنها نيوكليوتيدات مفردة أو جزيئات ذات عدد قليل من النيوكليوتيدات oligonucleotides. والعكس صحيح حيث يوجد بعض من الإنزيمات لا تبدأ من طرف الجزيء بل تبدأ عملها من داخل الجزيء ولذلك تسمى نيوكليينات

داخلية endonuclease. وبعض من النيوكليينيزات الداخلية متخصصة في كسر  
الجزئية في مواقع بين قواعد نووية معينة دون الأخرى.

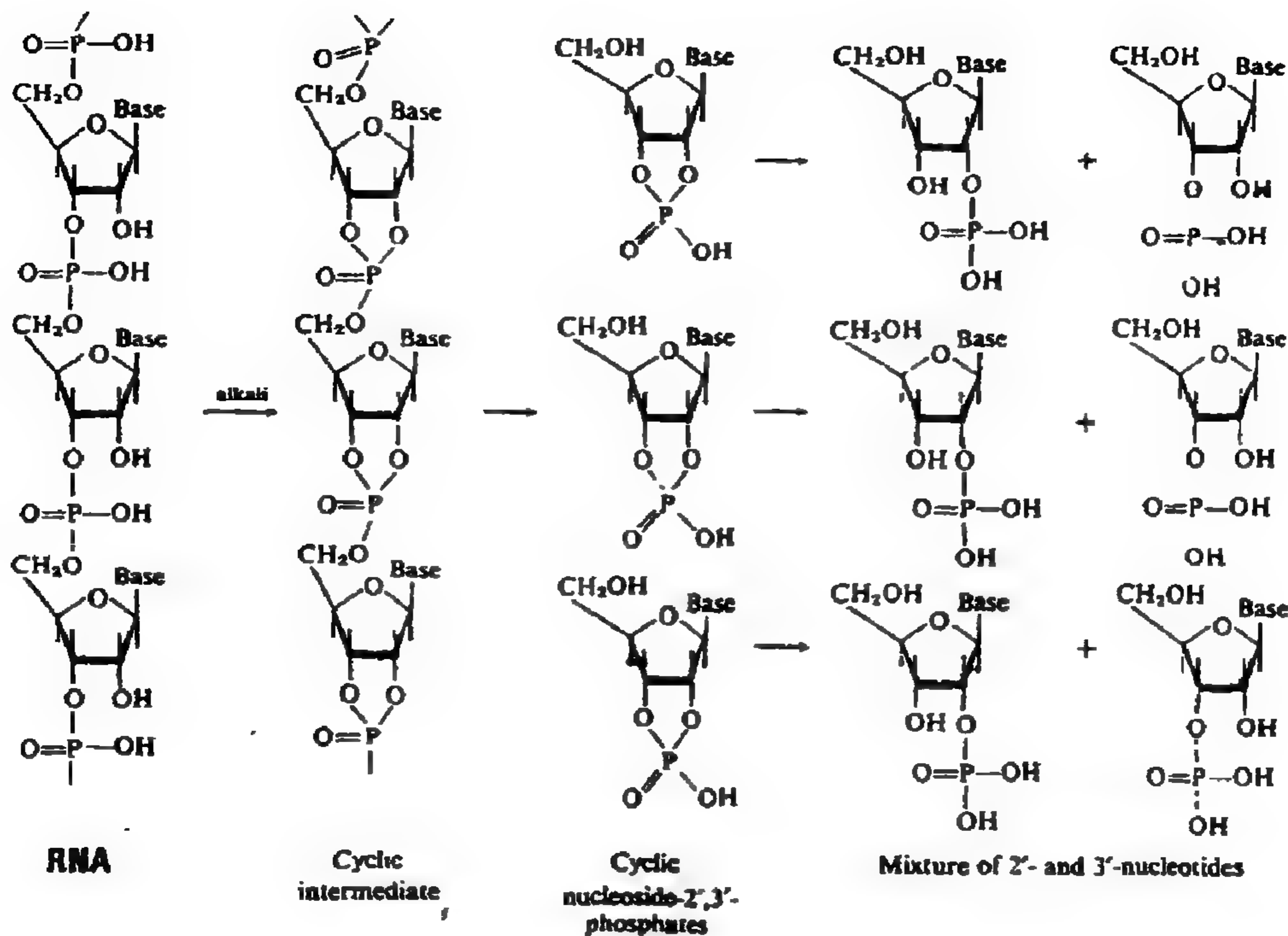
تقوم النيوكليينيزات بوظائف حيوية عديدة وهي فعالة ومفيدة في دراسة الأحماض  
النووية معملياً *in vitro* ومن أمثلة ذلك إنزيمات النيوكليينيزات الداخلية المتخصصة  
التحديد restriction endonucleases وهي عبارة عن مجموعة من الإنزيمات  
متخصصة في كسر الروابط في تتابع معين من القواعد.

إنزيم من الطحال spleen enzyme يحلل دنا إلى نيوكليوسيد-٣- فوسفات وإنزيم من  
سم الثعابين venom enzyme يحلل دنا إلى نيوكليوسيد-٥- فوسفات (شكل ٣١).



شكل ٣١ محلل دنا ينزيم من الطحال spleen وإنزيم من سم الثعابين.

يمكن أن يتحلل رنا بالإنزيمات ويمكن أن يتحلل أيضًا بالقلوية أى بمحلول قلوى (شكل ٣٢).



شكل ٣٢: تحليل رنا بالقلوى. خطوات تحليل رنا بالقلوى.

## طرق دراسة الجزيئات الكبيرة

### Methods Used to Study Macromolecules:

توجد طرق كثيرة تستخدم فى دراسة الجزيئات الكبيرة الحجم ومنها الكروماتوجرافى chromatography والقياس اللونى spectrophotometry والقوة الطاردة المركزية العادية centrifugation وقد سبق شرحها بالتفصيل أثناء دراسة القارئ ولذلك سيتم شرح طرق أخرى بالتفصيل وهى:

#### ١- الطرد المركزى ذوالمناطق

### Zonal centrifugation:

فى هذه الحالة يتم ملأ أنبوبة الطرد المركزى بواسطة محلول السكروز والذى يقل



تركيز تدريجياً من قاع الأنبوبة إلى أعلى. هذا التدرج في التركيز يحفظ المحلول من الخلط أو الأمتزاج نتيجة التعريض للقوى الميكانيكية أو قوى التفطيت convective disruptive forces. يتم ضبط تركيز وكثافة المحلول المراد اختبار به بحيث تكون أقل من كثافة محلول الطبقة السطحية من السكروز في الأنبوبة. توضع العينة على هيئة طبقة أعلى محلول الأنبوبة. يتم تشغيل الجهاز وتعريض الأنبوبة للطرء المركزى. فى هذا النوع من الطرد المركزى يتم تثبيت الأنبوبة قبل تشغيل الجهاز فى جزء من الجهاز عبارة عن أسطوانة أى جاكٲ هزاز دورانى swinging bucket rotor. بعد أتمام عملية الطرد المركزى يتم عمل ثقب فى قاع الأنبوبة ويتم تجميع قطرات المحلول من هذا الثقب. تمثل القطرات طبقات متتالية فى الأنبوبة. يتم اختبار وجود الجزيئات الكبيرة فى القطرات المختلفة وبالتالي يمكن التعرف على تركيز الجزيئات الكبيرة فى القطرات المختلفة وبالتالي فى المناطق المختلفة من أنبوبة الطرد المركزى. أما عن كيفية التعرف على وجود وتركيز الجزيئات الكبيرة فى القطرات المختلفة يكون بواسطة قياس درجة الأشعاع فى الجزيئات المختبرة radioactivity أو بواسطة درجة إمتصاص الضوء عند طول موجة معينة optical absorbance أو درجة الإصابة أى قدرة إصابة هذه الجزيئات الكائنات الحية biological infectivity أو نشاط الإنزيمات enzymatic activity.

يمكن أن تسمى هذه الطريقة بطريقة الطرد المركزى فى وجود منحدر لتركيز السكروز sucrose gradient centrifugation.

### ٢- الطرد المركزى المتزن

#### Equilibrium centrifugation:

وفى هذه الحالة يستعمل أيضاً منحدر للتركيز من محلول كلوريد السيزيوم CsCl بدلاً من السكروز. تستعمل هذه الطريقة للأحماض النووية والفيروسات عادة. وفى هذه الحالة يتم مزج المحلول المراد اختبار به مع كلوريد السيزيوم وبشرط أن تكون كثافة محلول السيزيوم مساوية لكثافة المحلول المختبر (جم/سم<sup>٣</sup>). أثناء الطرد

المركزي يحدث ترسيب لأيونات السيزيوم  $Cs^+$  لأنها ثقيلة. وحيث أنه يوجد أتوان بين سرعة ترسيب كاتيون السيزيوم في قاع الأنبوبة وبين الانتشار لكاتيون السيزيوم ليصبح تركيزه متساو في أجزاء الأنبوبة ونتيجة لذلك يحدث شبه أتران بين الترسيب والانتشار ونتيجة لذلك يوجد منحدر للتركيز لكاتيونات السيزيوم داخل الأنبوبة وحيث يكون أعلى تركيز في القاع وأقل تركيز على السطح. نتيجة لذلك تنتشر الجزيئات الكبيرة المراد اختبارها تبعاً لمنحدر تركيز كاتيون السيزيوم. ولذلك فإن الجزيئات الكبيرة تتحرك من أعلى الأنبوبة إلى أسفل في اتجاه القاع وتتوقف في منطقة معينة من الأنبوبة عندما تتساو كثافة الجزيئات الكبيرة مع كثافة محلول كلوريد السيزيوم. وفي نفس الوقت تتحرك الجزيئات الكبيرة من أسفل الأنبوبة إلى أعلى وحيث تستقر أيضاً في المنطقة السابقة عندما تتساو الكثافة. ولذلك تكون الجزيئات الكبيرة طبقة رقيقة في الأنبوبة ولذلك تسمى هذه الطبقة شريط أو حزمة band وحيث أنها رقيقة فتسمى شريط أو حزمة ضيقة narrow band. ولذلك فإذا أحتوى المحلول المختبر على جزيئات كبيرة الحجم متعدد الأنواع فإن كل نوع سنفصل عن الآخر في الأنبوبة من مسافة معينة من القاع وتبعاً لكثافته سنجد في الأنبوبة عدداً من الشرائط أو الحزم مساوية لعدد الأنواع المختلفة من الجزيئات وبذلك يتم فصل هذه الجزيئات عن بعضها. قوة التمييز لهذه الطريقة عظيم أي دقة الفصل عظيم حيث يمكن فصل نفس DNA عن بعضه ولكن الاختلاف الوحيد هو استبدال ذرة النيتروجين العادية بذرة نيتروجين مشعة أي استبدال ن ١٤ بواسطة ن ١٥ ولذلك تتغير الكثافة من ١,٧٠٨ جرام/سم<sup>٣</sup> في المحلول العادي إلى ١,٧٢٢ جرام/سم<sup>٣</sup> في المحلول المشع أي يمكن الحصول على حزمتين منفصلتين أحدهما للـ DNA العادي والأخرى للـ DNA المشع.

#### ملحوظة:

أ - يوجد تشابه بين الطريقتين السابقتين حيث أن أحدهما تستعمل منحدر التركيز للسكريز والأخرى تستعمل منحدر التركيز لكلوريد السيزيوم. ولكن في حالة منحدر

انسكروز لا يلعب السكروز دور مباشر في الفصل أما في حالة السيزيوم فإنه يلعب دور مباشر في الفصل. والاختلاف الثاني، حيث أنه في حالة زيادة مدة الطرد المركزي في حالة الطرد المركزي ذو المناطق فإنه يحدث ترسيب تام للجزيئات المختبرة ولذلك يجب أن تراعى المدة بدقة أما في حالة الطرد المركزي المتزنة فإنه بزيادة المدة لا يحدث ترسيب ولا تتأثر الحزم المنفصلة ولذلك فإن زيادة المدة غير مؤثرة إطلاقاً على الفصل حيث أن توزيع الجزيئات يكون متأثر بحالة الأتزان ولا تؤثر المدة على حالة الأتزان.

ب - من المعروف أن يمكن التعرف على بعض الصفات الهامة للجزيئات الكبيرة الحجم بواسطة الترسيب بواسطة قوة طاردة مركزية بسرعة فائقة.

وسرعة حركة الجزيئات الكبيرة تتوقف أساساً على الوزن الجزيئي وشكل الجزيء تسمى النسبة بين سرعة حركة الجزيء إلى قوة الطرد المركزي بأسم معامل الترسيب sedimentation coefficient واختصارها S ولذلك فإن:

$$S = \frac{\text{السرعة}}{\text{قوة الطرد المركزية}}$$
 وحدة S هي ١٠-١٣ ثانية وتسمى سيفيدبرج svedberg أو S1. ولذلك فمن المعتاد الإشارة إلى الجزيء وله S تساوى ٣٠ بأسم S ٣٠.

وحيث أن S تتوقف على وزن الجزيء وشكله ولذلك فإن التغيرات في S نتيجة للتغيرات في ظروف التجربة يمكن أن تستعمل كدليل لاكتشاف التغير في الوزن الجزيء نتيجة لتجمع الجزيئات أو نتيجة لأنفصالها وبثرتها وأيضاً تستعمل لاكتشاف التغير في الشكل مثل فك الجزيئات وحتى تصل إلى مرحلة تصبح مستقيمة إلى حد كبير أو العكس إتفاف الجزيئات على نفسها folding.

## ٢ - الهجرة في وسط غروي ومجال كهربائي:

### Gel Electrophoresis:

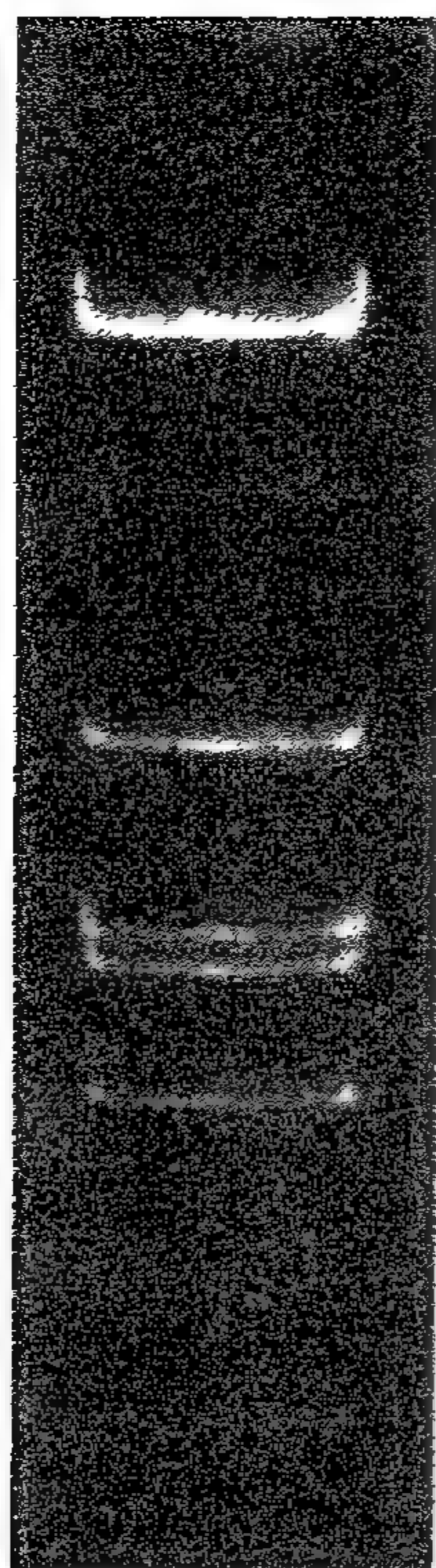
تحمل الغالبية العظمى من الجزيئات البيرة شحنة كهربائية ولذلك فإنها تتحرك في



المجال الكهربائي. عند توصيل قطبي بطارية بطفري أنبوبة أفقية تحتوى على محلول من البروتين موجب الشحنة فإن الجزيئات الموجبة تهجر من الطرف الموجب إلى الطرف السالب فى الأنبوبة. يتوقف اتجاه الهجرة على نوع الشحنة وتتوقف سرعة الهجرة على كمية الشحنات وحجم الجزيء.

وزن الجزيء لا يلعب دور مباشر فى سرعة الهجرة وذلك على العكس من اختبارات الترسيب فى القوة الطاردة المركزية.

ومن أكثر أنواع هذه الهجرة هى الهجرة فى وسط غروى gel ولذلك تسمى gel electrophoresis. يمكن ضبط هذا الاختبار بحيث تكون سرعة الهجرة متوقفة على الوزن الجزيئى للجزيء الغروى المستعمل عادة فى هذه التجارب عبارة عن أجاروز agarose أو بولى أكريل أميد polyacrylamide وفى حالة تشغيل الجهاز يتولد تيار كهربائى عبر الغروى وتتخلل جزيئات DNA فى أثناء هجرتها الثقوب الدقيقة الموجودة فى الغروى. يعتبر DNA سالب الشحنة نتيجة لوجود مجاميع الفوسفات على العمود الفقرى للجزيء. ولذلك يهاجر DNA إلى القطب الموجب للجزيء. وحيث أن الغروى عبارة عن شبكة متداخلة من الجزيئات فإن الجزيئات تهجر فى الغروى عبر الثقوب أو الفراغات الموجودة فى الشبكة. ولذلك فإن حركة وهجرة الجزيئات فى الغروى تتوقف على حجمها حيث أن الجزيئات الصغيرة تهجر أسرع من الجزيئات الكبيرة وأيضاً تتوقف على التركيب الثالثى tertiary structure الحقلة الزائدة الحلزنة أو المرتخية أو المفتوحة أو الشكل الشريطى للجزيء. وفى حالة DNA زائد الحلزنة supercoiled يكون منضغط تماماً very compact ولذلك يهاجر فى الغروى بسرعة كبيرة ويكون الأسرع فى الهجرة عنه فى الحالات الأخرى. وفى حالة DNA الشريطى فإن سرعة الهجرة تزداد بقلّة الوزن الجزيئى. نتيجة للهجرة تتكون شرائط أو حزم فى الغروى يمكن التعرف على هذه الحزم باستخدام صبغات معينة أو باستخدام مركبات مضيئة مثل حالة الفلورة نتيجة لوجود بروميد الإيثيديوم (شكل ٣٣).



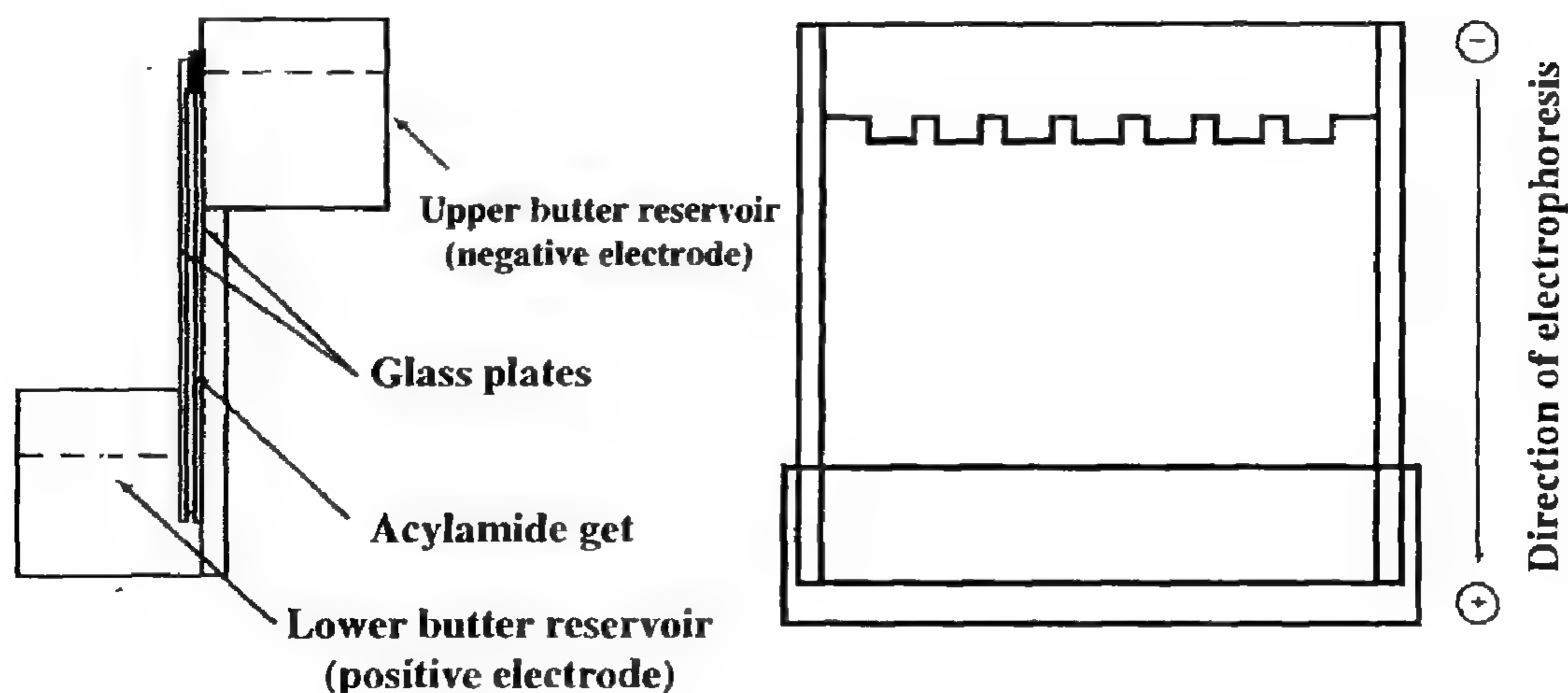
شكل ٣٣: الهجرة الكهربائية في الأجاروز لدنا الفاج لامدا للبكتيريا *E. coli*. كولاى والى يتم هضمه (تحليله) بواسطة إنزيم القطع المحدد *Eco R1* والذي يقطع دنا لامدا إلى ستة شظايا. إتجاه الهجرة من أعلى إلى أسفل. يصبح دنا مشع أى مضىء ويمكن رؤيته لمعاملته ببروميد الإيثيديوم.

يوجد نوع خاص من هذه الطريقة أو التحليل يسمى *pulsed field gel electrophoresis*. باستعمال *gel electrophoresis* العادية فإنه يمكن فصل جزيئات DNA أقل في حجمها من ٢٠ kb ولكن في حالة الجزيئات الأكبر حجمًا لا يمكن فصلها لأنها لا تتخلل مسام الغروى لكبر حجمها ولذلك لا يحدث لها هجرة أى حركة (شكل ٣٤، ٣٥).

فصل جزيئات DNA الكبيرة يتم بواسطة *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE). ولذلك فإن جزيئات DNA الكبيرة التى تتراوح بين ٢٠٠ إلى ٣٠٠٠ kb يمكن فصلها بواسطة PFGE. وفي هذه الطريقة أثناء التجربة يتم تغيير اتجاه الحقل

الكهربائي electric field دورياً على فترات. وجد أنه نتيجة لذلك تحدث هجرة لجزيئات DNA الكبيرة ويتم فصلها في حزم ولكن غير معروف حتى الآن آلية أو ميكانيكية حدوث ذلك أي أن الأساس العلمي لكيفية حدوث وسبب حدوث هجرة الجزيئات وفصلها غير معروف ولكن يعتقد أن تغيير اتجاه الحقل الكهربائي يسبب إعادة توجيه للجزيئات في الغروي وبذلك تنحسر وتتحرك snake خلال ثقوب ومسام الأجاروز.

Side view

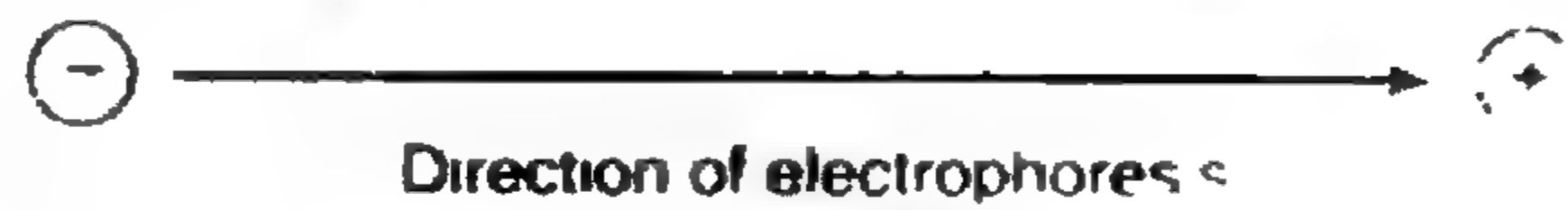
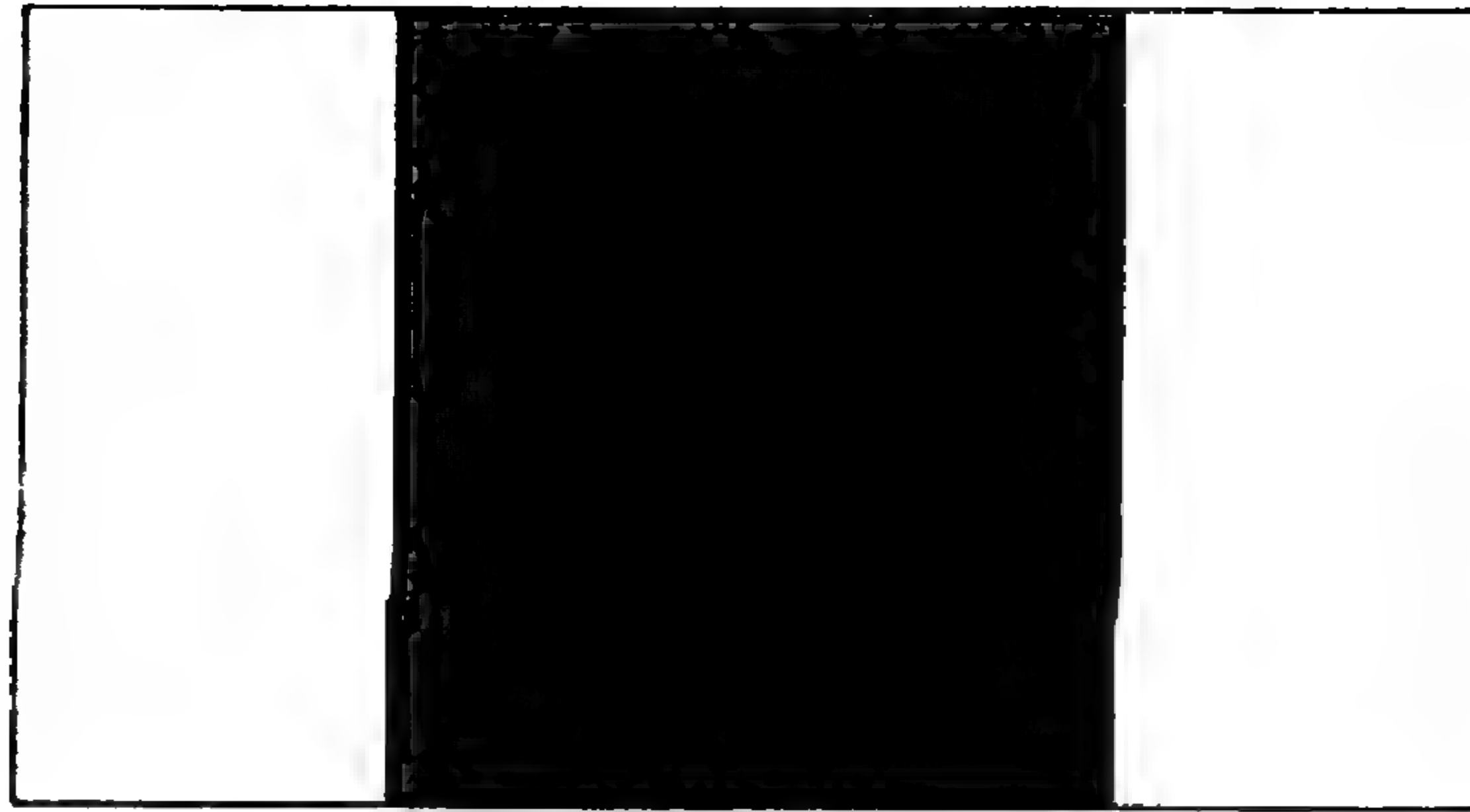


شكل ٣٤: الهجرة الكهربائية الرأسية في بولي أكريل أميد polyacrylamide والتي تستخدم في فصل أجزاء صغيرة من دنا.

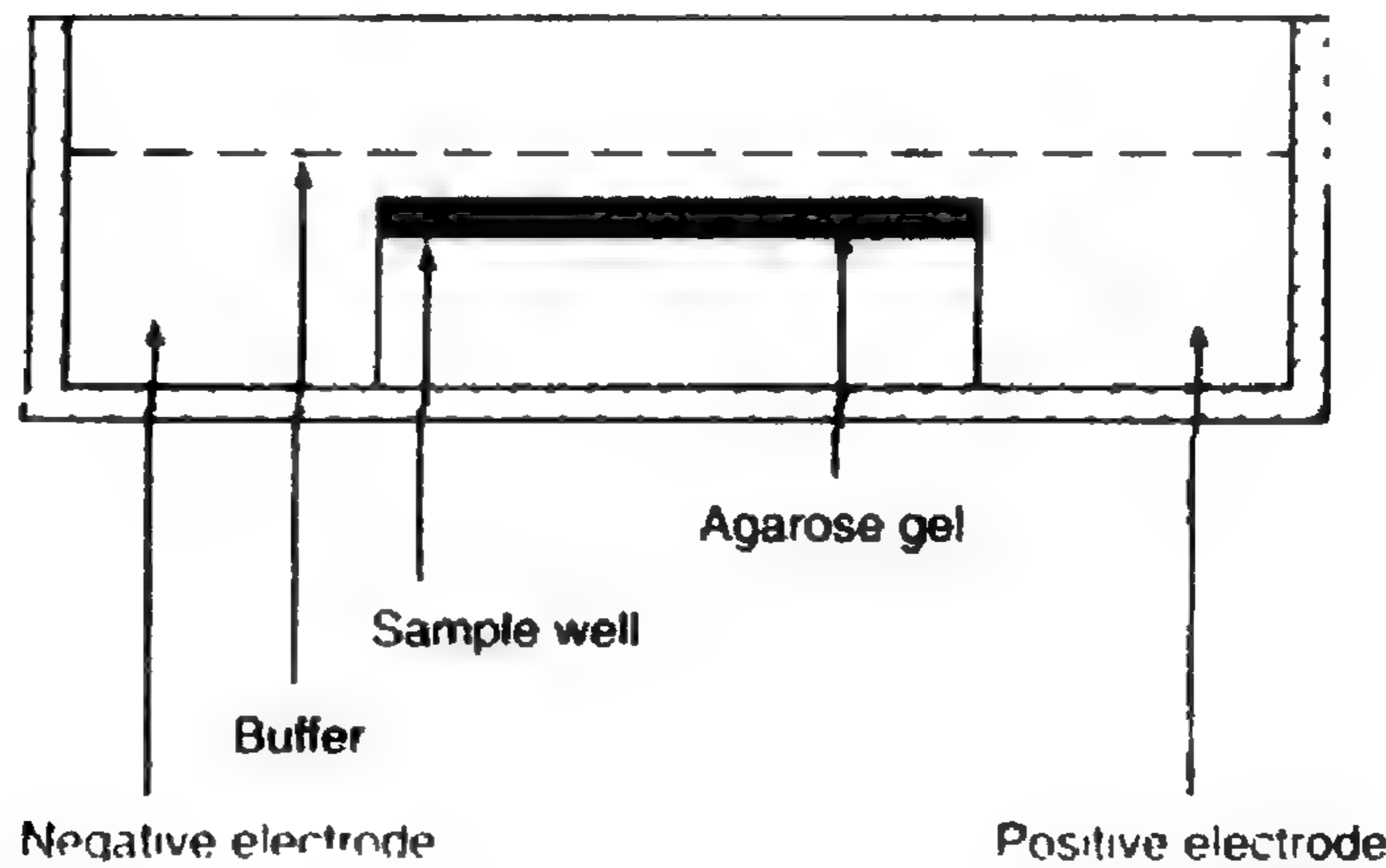
Vertical gel set-up for polyacrylamide electrophoresis



Front view



(B) Side view



شكل ٣٥: الهجرة الكهربائية الأفقية في الغروي الآجاروز. تستخدم في حالة الشظايا الكبيرة نسبياً من دنا. غروي الآجاروز يتم غمره بالمنظم buffer.

جزيئات DNA وخاصة كبيرة الحجم تكون حساسة وتتكسر أو تتجزأ بالجزر shearing. يمكن تلافي تقصف وتجزأ DNA بواسطة طمر embedding الخلايا في أجاروز قبل التحلل lysis. أثناء وجود الخلايا في مكعبات صغيرة من الآجاروز فإن الخلايا تتحلل برفقه gently ويتحرر منها DNA عادي غير متقصف. يمكن هضم DNA في مكعبات الآجاروز بواسطة restriction enzymes. باستخدام restriction

enzymes لها القدرة على هضم جزيئات الـ DNA أى قطع جزيئات DNA على مسافات متباعدة أى قطع مرة واحدة لكل 10<sup>3</sup> إلى 10<sup>4</sup> kb فإنه يمكن عمل خرائط restriction maps للكروموسوم باستعمال PFGE يمكن أيضاً عمل خرائط للجينات المنقولة cloned genes على خرائط restriction maps (يمكن تسميتها مجازاً خرائط القطع) باستعمال طريقة التهجين بين DNA و DNA - DNA hybridization. وبهذه الطريقة يمكن عمل خرائط للكروموسومات لكثير من الكائنات الحية.

يوضع البولي أكريل أميد بين لوحين زجاجيين بينهما فاصل رقيق على الجسائين ويوضع مثبت comb على القمة والذي يكون آبار العينة sample wells. بعد تجمد البولي أكريل أميد يتم إزالة الفاصلين والمشط. توضع العينة أو العينات فى الآبار مع وضع الألواح الزجاجية فى الجهاز. يتم صب المحلول المنظم buffer فى الحجرة العليا والحجرة السفلى ثم يتم توصيل الجهاز بالكهرباء ويكون الإلكترود السالب فى القمة والإلكترود الموجب فى القاعدة أى الحجرة السفلية.

بعد الفصل يتم إزالة الغروى من الجهاز ويتم نقعه فى محلول من بروميد الإيثيديوم. هذه المعاملة تسبب إشعاع دنا ويمكن رؤيته فى وجود الأشعة فوق البنفسجية.

**بعض الحقائق والخواص الهامة لـ رنا ودنا:**

أنظر الجداول (جداول أرقام ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤).

جدول ١ : بعض الحقائق والخواص الهامة لدنا .

الخاصية	في داخل النواة أو في منطقة شبه النواة (البكتيريا وغيرها)	في داخل عضيات الخلية مثل الميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء	خارج الخلية في بعض أجزاء من دورة الحياة
النوع	دنا الكروموسوم	فيروسات دنا (التي تهاجم البكتيريا والحيوان عدا التي تهاجم النباتات)	فيروسات دنا (التي تهاجم البكتيريا والحيوان عدا التي تهاجم النباتات)
عدد القواعد التقريبية	<div> <div>البكتيريا</div> <div>النباتات والحيوانات الراقية</div> </div> <p>٤ × ١٠<sup>٩</sup> زوج قاعدة</p>	١٠ <sup>٩</sup> زوج قاعدة	<p>فيروسات صغيرة      فيروسات كبيرة تصل</p> <p>٥ × ١٠<sup>٩</sup> زوج      إلى ١٠<sup>٩</sup> زوج قاعدة</p> <p>قاعدة</p>
إرتباطها بالبروتين	بكميات قليلة من البروتين فقط	مرتبطة	نعم مرتبطة
الوظيفة وملاحظات	تخزين المعلومات الوراثية في الخلية ٩٩٪ أو أثر في دنا	أحد مكونات دنا قليلة التركيز في الخلية	تحمل جميع الخواص الوراثية الأساسية للفيروس



جدول ٢ : بعض الحقائق والخواص الهامة لـرنا.

الخاصية	في داخل النواة أو في منطقة شبه النواة (البكتيريا وعددها)	في داخل عضيات الخلية مثل البلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا	في الريبوسوم أو حوله	خارج الخلية جزؤه من دورة الحياة
النوع	رنا رسول messenger RNA رنا النوية nucleolar RNA n-RNA (في حقيقيات النواة فقط) m-RNA	تشابه رنا الريبوسوم	رنا الريبوسومي r-RNA رنا الناقل t-RNA	فيروسات رنا (نباتات وحيوانات وبكتيريا)
عدد النواعد المتفرقة	$10^2 - 10^4$ زوج قاعدة		s5 s16 s23 ٧٠-٨٠ زوج قاعدة ١٢٠ ١٦٠٠ ٣٢٠٠ قاعدة	$10^2 - 10^4$ زوج قاعدة
ارتباطها بالبروتين	أساس لتخليق البروتين		نعم ترتبط أساس لتخليق البروتين	نعم ترتبط مع وجود إستثناءات
الوظيفة وملاحظات	يخلق وينقل الريبوسوم يخلق في النواة ويتجمع في النوية		موقع تخليق نقل الحامض الأميني المنشط إلى البروتين	يحمل جميع الخواص الوراثية الأساسية للفيروس

Table 4 The various types of nucleic acid


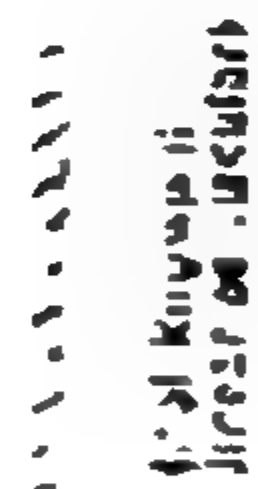

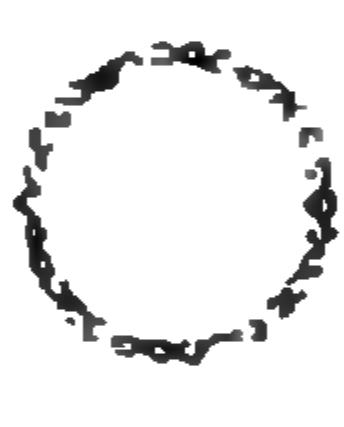



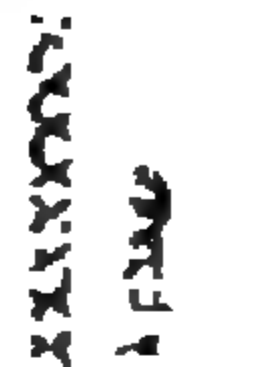
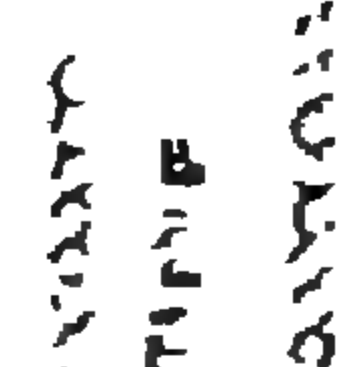




SITE	Inside the nucleus (or nuclear zone in those cells, e.g. bacteria that do have a clearly defined nucleus, see "prokaryotes" and "eucaryotes")		The remainder of the cell		Outside the cell (for part of the time)
	Within organized structures, such as chloroplasts and mitochondria	Not within organized structures			
DNA					
Type	Chromosomal DNA (bacteria)	Chromosomal DNA (higher cells)			DNA of viruses (those attacking some animals and bacteria, but not plants)
Approx. number of bases	~ 4x 10 <sup>6</sup> base pairs	~ 5x 10 <sup>9</sup> base pairs in total chromo-	~ 10 <sup>4</sup> base pairs		Small viruses ~ 5x 10 <sup>3</sup> Large viruses up to 10 <sup>5</sup>
Topology		 or 	 or 	 or 	 or 
Associated with Protein?	Small quantities of protein only	Large quantities of protein (mostly basic but some neutral or acidic)	Yes	Yes	Yes
Function and remarks	Storage of genetic information in the cell 99% or more of the DNA in the cell	Minor component of DNA of cell			Carries all essential genetic features of the virus

Table 3 The various types of nucleic acid

SITE	Inside the nucleus (or nuclear zone in those cells, e.g. bacteria, that do have a clearly defined nucleus, see "procaryotes" and "eucaryotes", Ch 10)		The remainder of the cell		Outside the cell (for part of the time)
	Within organized structures, such as chloroplasts and mitochondria		Not within organized structures		
RNA Type	Messenger RNA (m-RNA)	Nucleolar RNA (n-RNA; eucaryotes only)	Ribosome-like objects (see next column) are found in these structures	Ribosomal RNA (r-RNA) <sup>3</sup> types: <sup>*</sup> 55 165 235	Amino-acyl trans- fer RNA (t-RNA)
Approx. number of bass	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>			120 1600 3200	70 - 80
Topology					
Associated with Protein?				Yes	Usually except when replicating but occasionally Wound Tumour Virus Yes (exceptions exist)
Function and remarks	m-RNA is synthe- sized here, then migrates to the ribosome (q.v.) carrying the genetic information re- quired for protein synthesis	Non-messenger RNA is synthesized in the nucleus and is assembled in a zone (visible only during some stages the life cycle of the cell) called the nucleolus. Ribosomal RNA (q.v.) predominates		Site of synthesis of protein	Transfers activated amino- acid to ribosomal- mes- senger RNA com- plex  As for DNA Secondary and tertiary struc- ture controlled by the virus protein

<sup>\*</sup> These are sedimentation coefficients for RNA from bacterial ribosomes. Ribosomes from higher cells contain RNA with slightly different sedimentation coefficients (see p 438).





الباب الثاني

البروتينات





## البروتينات Proteins

يعتبر جزيء البروتين عبارة عن تركيب ثلاثى الأبعاد **three-dimensional structure** ويتحدد هذا التركيب بواسطة تتابع الأحماض الأمينية. تعتبر البروتينات أساسية فى الهندسة الوراثية والوراثة ووراثة الميكروبات والبيولوجيا الجزيئية ولذلك سنشرحها بشئ من التفصيل.

### التركيب الكيماوى لعديد الببتيدات:

#### Chemical Structure of a Polypeptide Chain

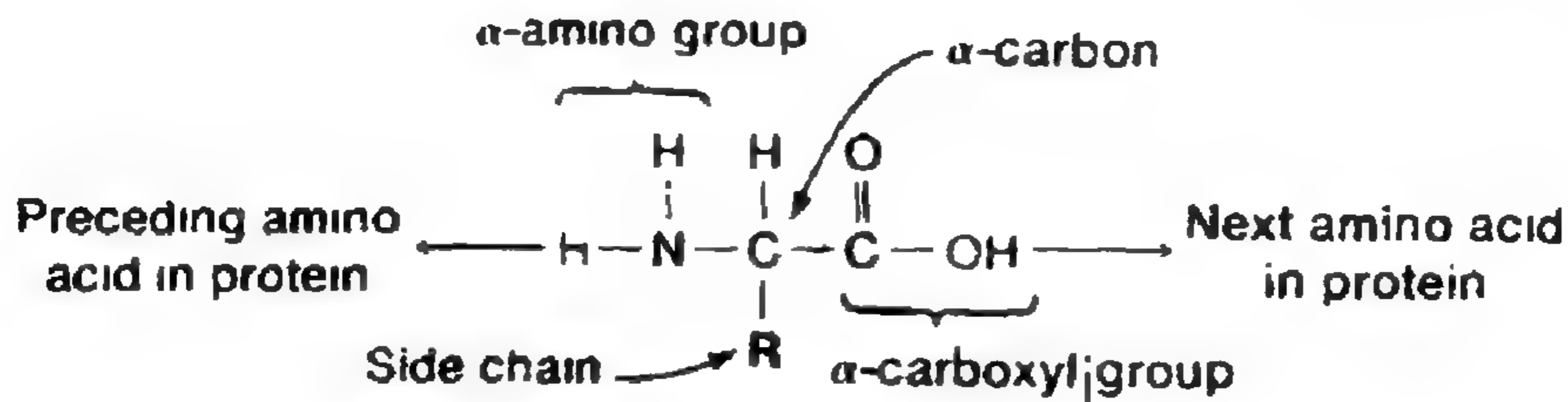
يتكون جزيء البروتين من سلسلة أو أكثر من عديد الببتيدات. والوحدة البنائية فى عديد الببتيدات هى عبارة عن عشرون حامض أمينى مختلف. يتكون الحامض الأمينى فى الغالبية العظمى من الأحوال من ذرة كربون تسمى ألفا كربون  $\alpha$  carbon ويلتحم بها مجموعة أمين ومجموعة كربوكسيل وسلسلة جانبية يطلق عليها R أى Rgroup (شكل ٣٦) والذي يختلف عن ذلك فقط هو الحامض الأمينى برولين. وتختلف السلسلة الجانبية فى نوعها فقد تكون حامضية أو قاعدية أو كارهة للماء أو تحتوى على مجموعة **sulphydryl**. وكل حامض أمينى يمكن تحديد خواصه الطبيعية والكيميائية بالسلسلة الجانبية. وفى سلسلة عديد الببتيدات يرتبط الحامض الأمينى بمجموعة أمين مع مجموعة كربوكسيل حامض أمينى آخر ويتكون بذلك رابطة ببتيدية وينتج عن ذلك خروج جزيء الماء وتكوين مجموعة ببتيدية **peptide group** (شكل ٣٧) ولذلك فإن سلسلة عديد الببتيدات تتكون من بلمرة الأحماض الأمينية وحيث أن ذرات ألفا كربون ومجاميع الببتيدات تتبادل مع بعضها لتكون عمود فقرى للجزيء شريطى **linear** ويبرز من العمود الفقرى نتوءات جانبية من ذرة ألفا كربون عبارة عن بقية جزيء الأحماض الأمينية دون أن تشارك فى تركيب العمود الفقرى (شكل ٣٨). يشير اللفظ شريطى **linear** إلى أن العمود الفقرى غير

متفرع ولكن يكون مطوى كثيراً أى أن شريطى هنا يعنى عدم التفريع وليس الالتواء أو الطى. يتكون عديد الببتيدات المثالى من سلسلة تحتوى ٣٠٠-٧٠٠ حامض أمينى ولها وزن جزيئى يتراوح بين ٣٠,٠٠٠ إلى ٧٠,٠٠٠ ولكن يمكن أن توجد سلاسل أقل فى طولها من ذلك كما يمكن أن تكون أطول من ذلك. يمكن أن تحتوى السلسلة على أكثر من ألف حامض أمينى ولكن ذلك نادراً. كثيراً من البروتينات تحتوى على عديد من الببتيدات وفى هذه الحالة قد يصل الوزن الجزيئى للبروتين إلى ٥٠٠,٠٠٠.

### التركيب الطبيعى لعديد الببتيدات:

#### Physical Structure of a Polypeptide Chain

لا تعتبر سلسلة عديد الببتيدات مستقيمة تماماً حيث أن الروابط بين C-N وبين C-C وحيث تشارك فيها ألفا كربون غير مستقيمة ولذلك ينتج عن ذلك شكل زجاجى (شكل ٣٨). وفى الحقيقة لا يوجد عديد الببتيدات مستقيم بل يكون ملوى بدرجة معقدة كما سيتم شرحه.



شكل ٣٦: التركيب الأساسى لألفا حامض أمينى OH α-amino على الطرف فى اليمين، H على الطرف فى الشمال يستخدمان لعمل الرابطة الببتيدية. لاحظ ذرة الكربون ألفا α-carbon.

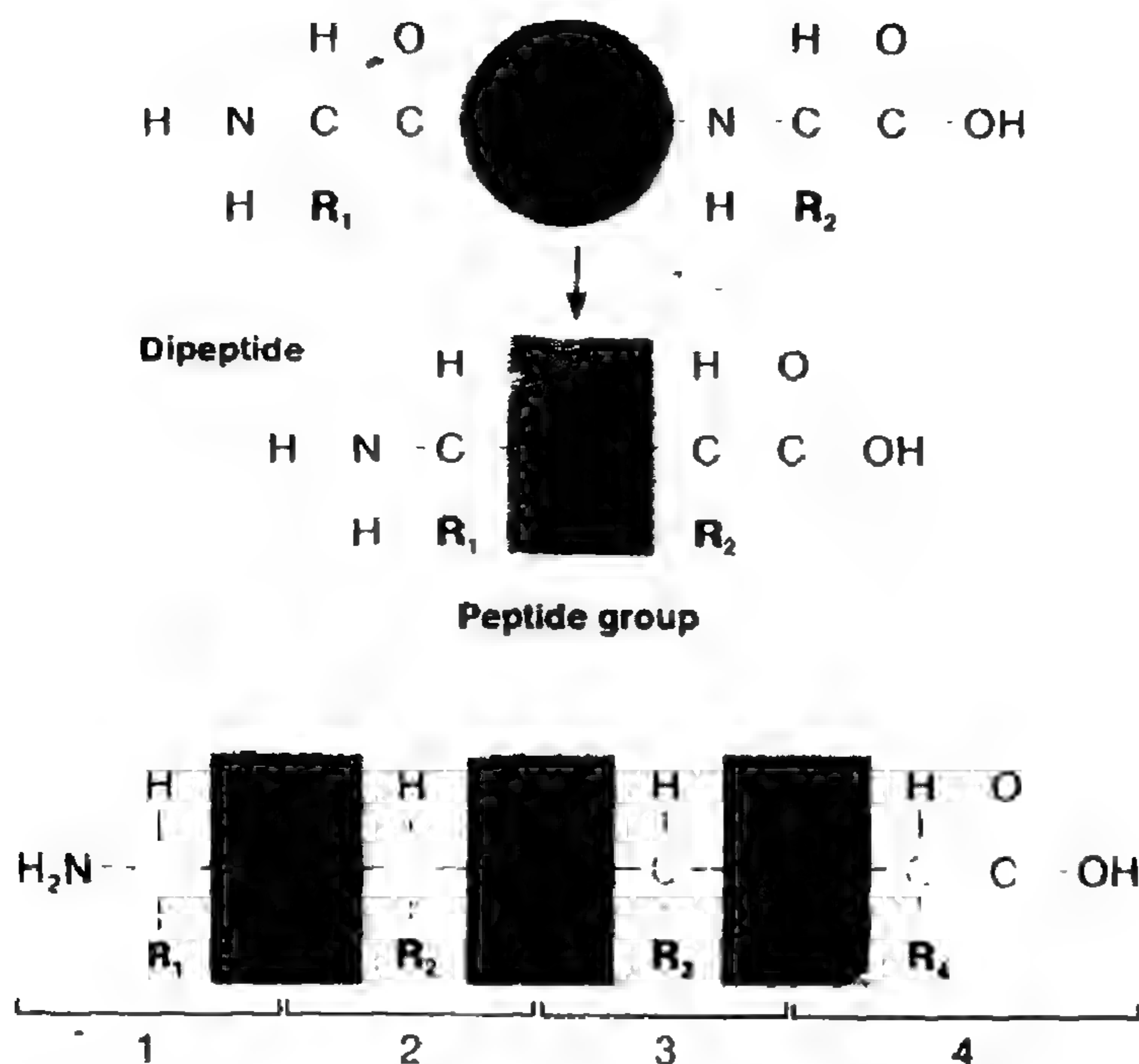
### طى سلسلة عديد الببتيدات:

#### Folding of a Polypeptide Chain

توجد قواعد عديدة تتحكم فى كيفية طى عديد الببتيدات وهى كما يلى:

١ - تعتبر الرابطة الببتيدية لها جزئياً خواص الروابط المزدوجة ولذلك تميل إلى

أن تكون مستوية وفي مستوى واحد constrained to be planar. يحدث دوران حر فقط بين ذرة كربون ألفا ومجموعة الببتيد. ولذلك فإن سلسلة عديد الببتيدات مرنة flexible نسبياً ولكنها ليست مرنة تماماً وحيث يكون في حالة المرونة التامة أن جميع الروابط تظهر حالة دوران حر.



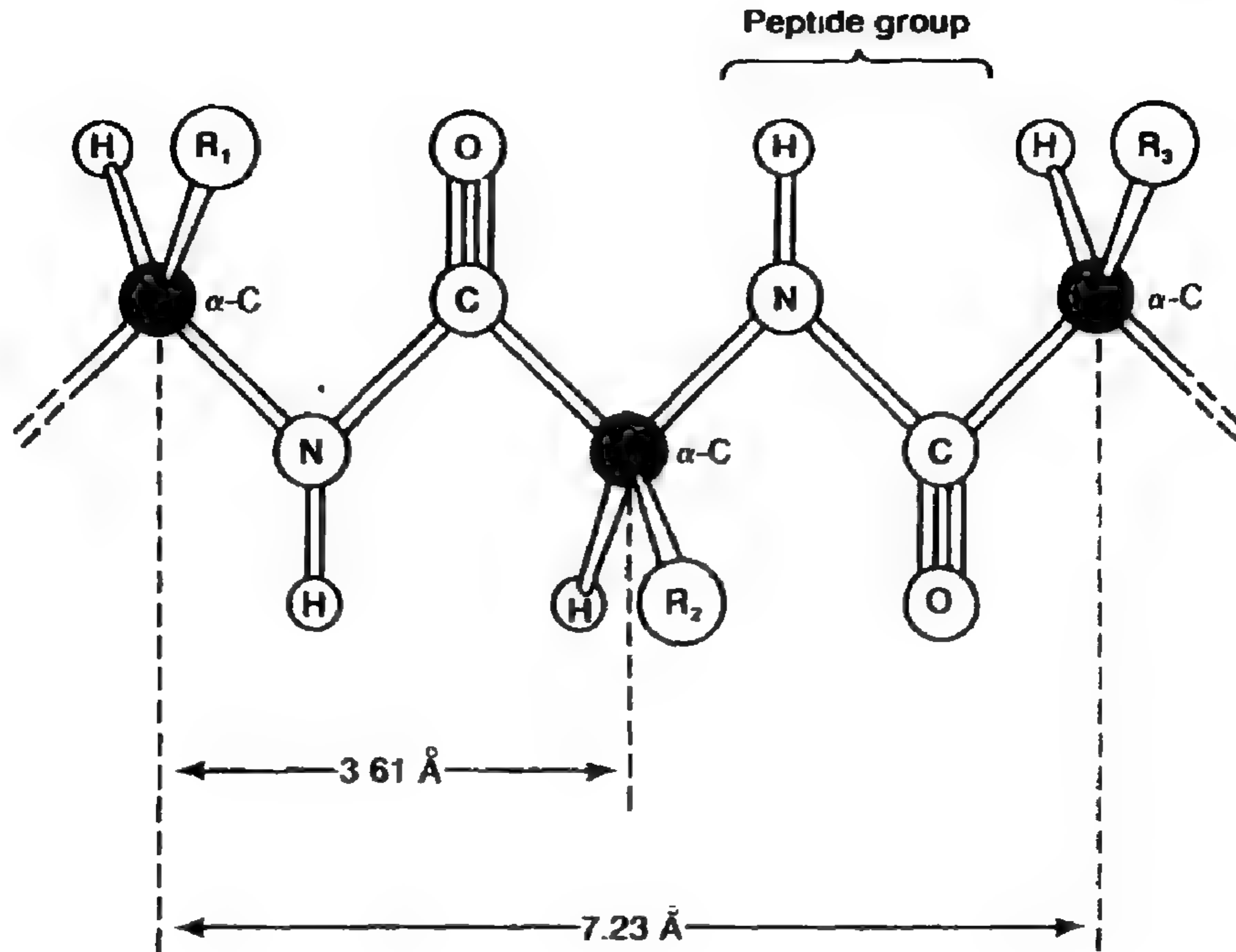
شكل ٣٧: تكوين ثنائي الببتيد dipeptide من التحام حامضين أميين وخروج الماء وتكوين رابطة ببتيدية وتكوين مجموعة ببتيدية peptide group. الشكل السفلي رباعي الببتيد tetrapeptide يوضع ألفا كربون ومجاميع ببتيدية  $\alpha$  carbon and peptide groups.

٢ - السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية لا يمكن أن تتداخل overlap مع بعضها. ولذلك فإن ترتيب تكوين العمود الفقري للجزيء لا يكون اعتباطي تماماً أو اعتباطي حقيقياً truly random حيث أن بعض التكوينات والتوجيهات certain orientations تكون غير ممكنة أي محال حدوثها.

٣ - وجود مجموعتين ذات شحنات متماثلة لا يمكن أن تكون قريبة من بعضها.



ولذا فإن الشحنات المتماثلة تميل إلى أن تسبب تمدد أو اتساع extension السلسلة.



شكل ٣٨: تركيب افتراضى لجزء من سلسلة عديد الببتات. طول كل amino acid residue هو ٣٦,١ نانومتر. وكل مسافة الوحدة أو كل مسافة مكررة repeat distance ٧٢,٣ نانومتر.

٤ - الأحماض الأمينية التي تتميز بأن لها سلسلة جانبية قطبية تميل إلى أن تكون على سطح البروتين وملاصقة للماء.

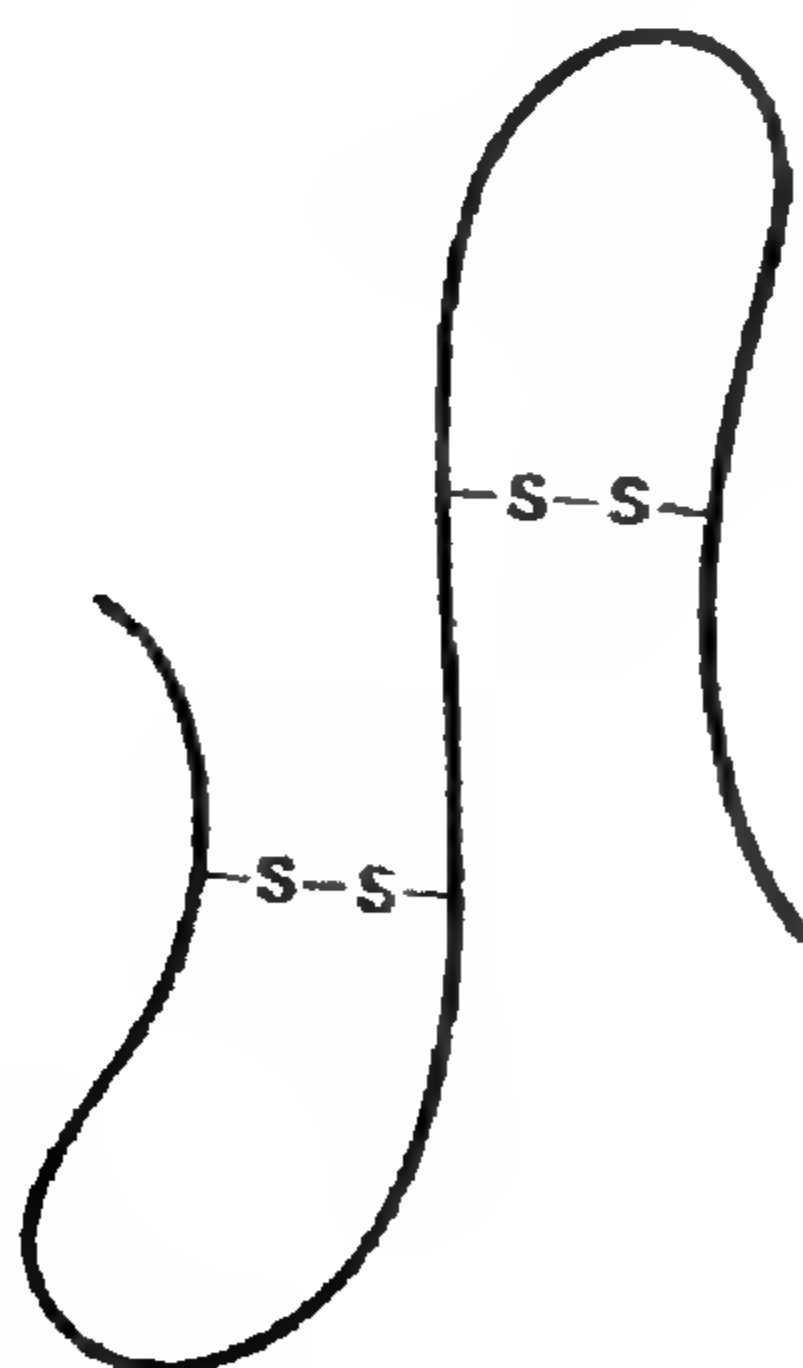
٥ - الأحماض الأمينية التي تتميز بأن لها سلسلة جانبية غير قطبية تميل إلى أن تكون داخلية وتميل السلاسل الجانبية الكارهة للماء فى أن تتجمع مع بعضها فى عنقيد.

٦ - تميل الروابط الإيدروجينية أن تتكون بين الأوكسجين مرتبط بذرة كربون carbonyl oxygen لرابطة ببتيدية وبين الإيدروجين المرتبط بذرة النيتروجين فى رابطة ببتيدية أخرى. تسبب هذه الروابط الإيدروجينية نشوء

نوعين رئيسيين من عديد الببتيدات وعما تسميان حلزون ألفا  $\alpha$ -helix وتركيب بيتا  $\beta$ -structure.

٧ - تتفاعل المجموعة SH أى sulfhydryl للحامض الأميني سستئين مع نفس المجموعة لحامض أميني سستئين تال لتكوين رابطة تعاونية بين ذرة الكبريت وذرة الكبريت الأخرى أى S-S وتسمى هذه الرابطة disulphide. تسبب هذه الروابط ضغط على تركيب جزيء البروتين. وقد وجد في خلايا البكتيريا حيث يعتبر السيتوبلازم بيئة مختزلة reducing environment فإن سيتوبلازم البكتيريا يمنع تكوين هذه الرابطة في بروتين السيتوبلازم ولكن يمكن أن توجد هذه الرابطة في البروتينات المفرزة (شكل ٣٩).

وحيث أن تركيب البروتين يتحدد بواسطة تتابع الأحماض الأمينية فإن الإخلال بهذا التتابع من شأنه تغيير تركيب البروتين كله وذلك بإحلال حامض أميني بآخر أى أستبدال حامض أميني بحامض آخر أى أستبدال حامض أميني غير قطبي بواسطة حامض أميني قطبي. ولكن أحيانا أخرى قد يكون العكس حيث لا يؤثر الأستبدال على تركيب البروتين ومثال ذلك أستبدال حامض أميني غير قطبي بآخر غير قطبي أو يكون الأستبدال له تأثير ضعيف.



شكل ٣٩: سلسلة عديد الببتيدات توضح أربعة جزيئات سستئين تكون رابطتين ثنائية السلفيد two disulfide bond.

شكل سلسلة عديد الببتيدات ذو الثلاثة أوجه **three-dimensional shape** يتحدد نتيجة للتوازن بين السبعة عوامل السابق ذكرها. يوجد عامة بين سلاسل مختلفة من عديد الببتيدات وأيضاً في أجزاء مختلفة من السلسلة الواحدة من عديد الببتيدات تماثل جيومتري منتظم على هيئة صفوف **geometrical regular arrays** تتكون هذه الصفوف نتيجة لوجود روابط إيدروجينية بين مجاميع ببتيدية مختلفة كما سيتم شرحه في الجزء التالي.

يعتبر طي جزيء البروتين من الأهمية بمكان حيث أن خواص أو غالبية خواص البروتين تتحدد نتيجة لوجود الشكل ذو الثلاثة أوجه. ومثال ذلك أن قدرة الإنزيمات على التفاعل وخاصة في مواقع التفاعل **catalytic sites** تتحدد بواسطة قدرتها على تقريب وتجميع وتركيز أجزاء كثيرة متباعدة من سلسلة عديد الببتيد. وجد أيضاً أن اختلال نظام طي جزيء البروتين بأي طريقة يسبب فقد الجزيء لخواصه الحيوية.

### **دور الروابط الإيدروجينية في تكوين حلزون ألفا وتركيب بيتا**

#### **Hydrogen-Bonded Conformations: The $\alpha$ -Helix and $\beta$ Structure**

في غياب التفاعلات أو حتى أي تفاعل بين الأجزاء المختلفة لسلسلة الببتيدات فإنه يحدث دوران حر **free rotation** لكل رابطة موجودة عدا الرابطة الببتيدية ويحدث نتيجة لذلك عدد كبير من التغيرات في السلسلة وتعرف هذه التغيرات في مجموعها باسم حلزون أعتباطي **random coil**. يمكن أن تحدث تفاعلات في سلسلة عديد الببتيدات وذلك بتكوين رابطة إيدروجينية بسهولة بين ذرة إيدروجين في مجموعة الببتيد **peptide group** أي **N-H** وبين ذرة أوكسجين في مجموعة **carbonyl** في ببتيد آخر.

وفي حالة غياب جميع التفاعلات الجانبية الأخرى **side chain interactions** فإن

أكثر تركيب ثابت ذو روابط إيدروجينية من هذا النوع يسمى حلزون ألفا  **$\alpha$ -Helix**.

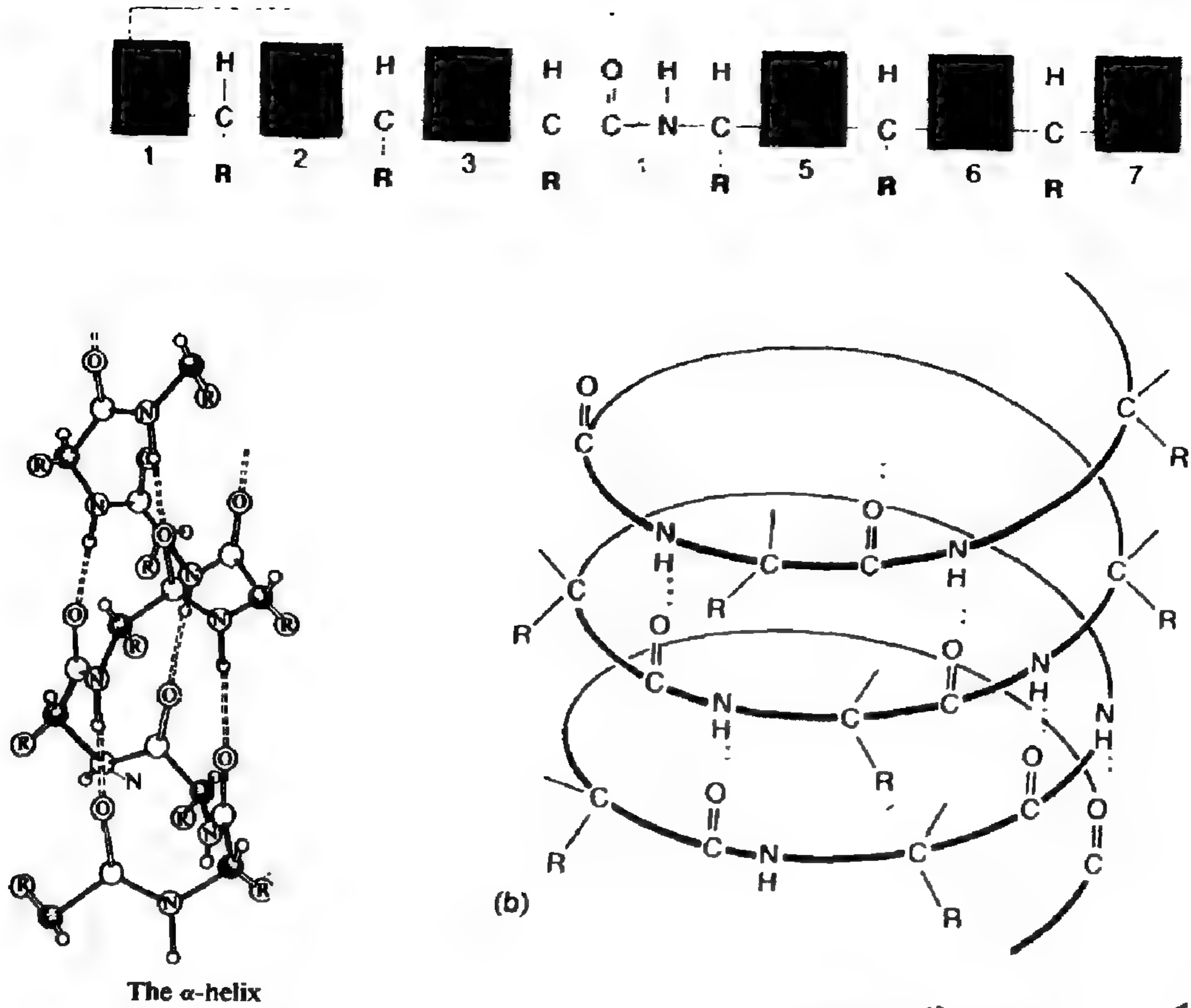
ويتميز حلزون ألفا بأن سلسلة عديد الببتيدات تصبح حلزونية الشكل وتصبح ثابتة



فى شكلها نتيجة لوجود روابط إيدروجينية بين مجاميع الببتيدات peptide groups. يوجد نظام خاص وترتيب لهذه الروابط بحيث أن كل مجموعة ببتيدية تتصل بواسطة روابط إيدروجينية بمجموعتين ببتيديتين أخريتين أحدهما تسبق هذه المجموعة بثلاث وحدات أى مجاميع ببتيدية والأخرى تلى هذه المجموعة بثلاث مجاميع ببتيدية (شكل ٤٠). يكون لهذا الحلزون ألفا مسافة ثابتة بين الأجزاء المتماثلة فى لفتى حلزون متتاليتين وتسمى مسافة التكرار repeat distance وهى ٥,٤ نانومتر وللحلزون قطر طوله ٢,٣ نانومتر ويحتوى الحلزون فى اللفة الواحدة ٣,٦ حامض أيامينى ولذلك يعتبر هذا الحلزون أكثر إحكاماً tighter من حلزون DNA.

يعتبر الشكل حلزون ألفا لعديد الببتيدات هو الشكل المفضل لعديد الببتيدات حيث أن جميع وحداته monomers متماثلة التوجيه وكل وحدة تكون روابط إيدروجينية كما فى الوحدات الأخرى. وفى حالة سلسلة عديد الببتيدات والتي تتكون من الحامض الأمينى جليسين فأنها تسمى عديد الجليسين polyglycine وهى تفتقر إلى المجموعة الجانبية حيث أن الجليسين ليس له مجموعة جانبية وبدلاً منها ذرة إيدروجين ولذلك لن يكون لها أى تفاعلات جانبية أخرى ولذلك فأنها تكون حلزون ألفا فقط أى تدخل فى تركيب  $\alpha$  مع عدم وجود أى تفاعلات جانبية.

أما عن دراسة حلزون عديد الليسين polylysine فأنه يوضح كيف أن البيئة تؤثر على تركيب البروتين. وحيث أن الليسين سلسلة جانبية تحتوى على مجموعة  $\text{NH}_2$  أخرى فأن هذه المجموعة تصبح مشحونة فى درجة pH معينة أو درجات pH معينة وغير مشحونة فى درجات أخرى. عندما تكون هذه المجموعة الأمينية غير مشحونة أنها تكون حلزون ألفا وعندما يتغير pH البيئة وتصبح السلسلة الجانبية مشحونة فأنه يحدث تنافر نتيجة لوجود الشحنات المتماثلة والتي تحطم الشكل الحلزوني ويصبح الجزيء غير حلزوني ويصبح تقريباً مستقيم أو ممتد أى غير حلزوني.



شكل ٤٠ : خواص ألفا helix:

(a) موقع الرابطتين الإيدروجينيتين والتي تحدث في المجموعة الببتيدية رقم ٤. أرقام المجموع الببتيدية موضحة أسفل الشكل.

(b)  $\alpha$ -helix تم رسم في ثلاثة أبعاد three dimensions ليوضح كيف أن الروابط الإيدروجينية تسبب ثبات التركيب. النقاط توضح مواقع الروابط الإيدروجينية. ذرات الإيدروجين التي لا تدخل في تركيب الروابط الإيدروجينية تم حذفها لسهولة التوضيح.

وفي حالة البروتينات التي تحتوى على تركيب حلزوني لعديد الببتيدات ويمتد هذا الحلزون لمسافة طويلة يصبح البروتين صلب ليفي rigid and fibrous (ليست جميع البروتينات الصلبة الليفية تتكون من حلزون ألفا أى أنه يمكن أن توجد بروتينات صلبة وليفية لا تتكون من سلاسل حلزون ألفا). يوجد هذا النوع من البروتين فى كثير من البروتينات التركيبية مثل ألفا كيراتين أو كيراتين ألفا  $\alpha$ -keratin الموجود فى الشعر والأظافر والحوافر.

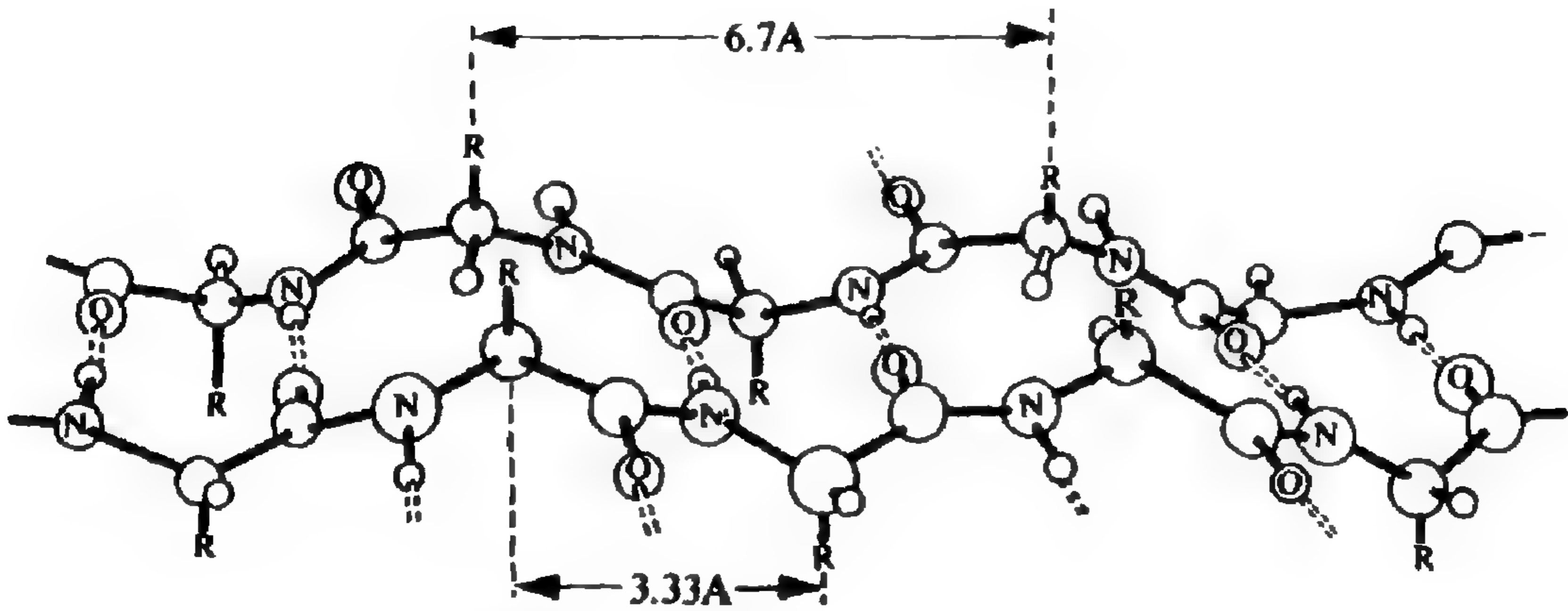
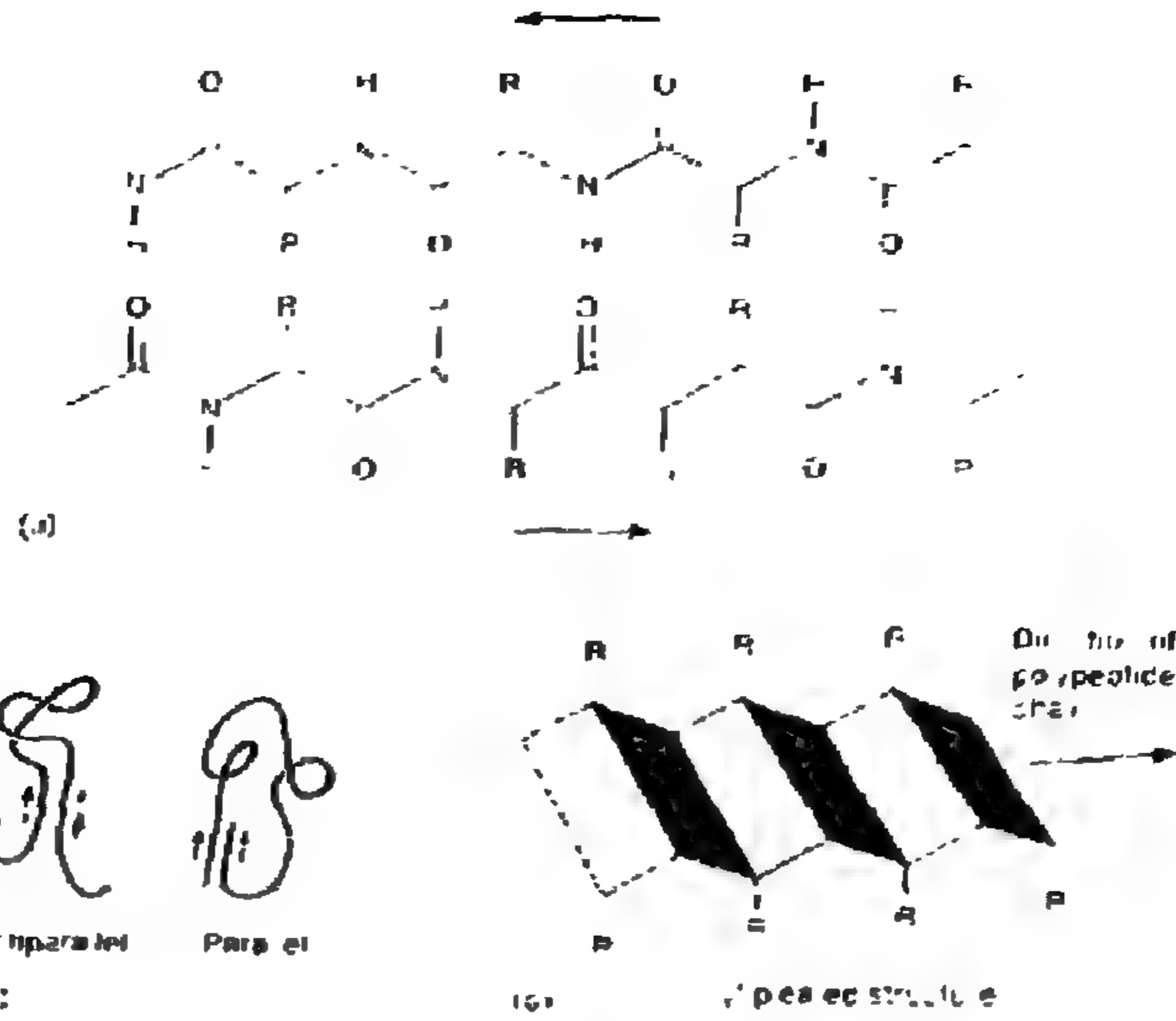
يوجد نوع آخر من عديد الببتيدات يتكون نتيجة لوجود الروابط الإيدروجينية يسمى تركيب بيتا  $\beta$ -structure وفي هذه الحالة يكون الجزيء ممتد مموج مفرد غير حلزوني ومسافة التكرار repeat distance ها هي ٧ نانومتر ويوجد روابط إيدروجينية بين وحدات الببتيدات الموجودة في جزيئات عديد الببتيدات والتي تكون مقابلة لبعضها ومتوازية ومتراكبة على بعضها.

(Hydrogen bonds form between peptide groups of polypeptide segments lying adjacent and parallel with one another).

أما المجاميع الجانبية R فأنها توجد جانبياً أعلى وأسفل السلسلة الرئيسية (شكل ٤١).

يمكن لقطعتين أي جزئين من سلسلة واحدة لعديد الببتيدات أو جزئين من سلسلتين مختلفتين أن يكون نوعين من تركيب بيتا وتتوقف ذلك على التوجيه النسبي للقطعتين. ففي الحالة الأولى أو في النوع الأول تكون القطعتين متوازيتين أي لهما نفس التوجيه same orientation أي أن الطرف N إلى الطرف C يكون اتجاه نفس القطعتين أو العكس الطرف C إلى الطرف N يكون اتجاه نفس القطعتين (الطرف C يسمى C terminal والطرف N يسمى N terminal). وهذه الحالة يسمى التركيب بيتا متوازي parallel. وفي الحالة الثانية أي النوع الثاني إذا كان الطرف N إلى الطرف C في قطعة وفي القطعة الأخرى الطرف C إلى الطرف N أي الاتجاه عكسي فيسمى التركيب بيتا غير متوازي anti parallel (شكل ٤١). وعندما تتفاعل سلاسل عديد الببتيدات مع بعضها بالطريقة السابق شرحها فإنه يتكون تركيب معين متموج يسمى السطح المتموج بيتا B-pleated sheet يمكن أن تتجمع هذه الأسطح المتموجة مع بعضها أي تتقارب وتتلامس وتصطف وتتماسك مع بعضها على هيئة مجاميع stacked ويكون التماسك والالتصاق بين هذه الطبقات بواسطة قوى جذب فان درفالس Van der Waals Forces وحيث تصطف هذه الطبقات على هيئة أعمدة طويلة وعادة يوجد هذا التركيب في أنواع التراكيب الليفية مثل الحرير.





The  $\beta$ -pleated sheet

## 72 Comprehensible biochemistry

- سكن ١ : تراكيب سنا  $\beta$ -structures = رقائق بيتا Beta sheets:
- (a) سلسلتين من عديد الببتيدات في وضع معاكس antiparallel ومرتبطتين بروابط إيدروجينية. المجموعة الجانوية R توجد بالتبادل أعلى ثم أسفل.
- (b) تراكيب متوازي parallel ومعاكس antiparallel لتراكيب بيتا في جزئيء واحد (رقائق بيتا).
- (c) عدد كبير من سلاسل عديد الببتيدات المتقاربة adjacent chains تكون  $\beta$ -pleated sheet.

## البروتين الليفى والبروتين الحبيبي:

## Fibrous Versus Globular Proteins

قليل من البروتينات حلزون ألفا نقي أو تركيب بيتا نقي. تحتوى البروتينات عادة على كلا النوعين حيث أن مناطق منها تكون حلزون ألفا ومناطق تكون تركيب بيتا أى عادة تكون البروتينات خليط من النوعين. وحيث أن هذه التراكيب ألفا أو بيتا صلبة فإن البروتين الذى يحتوى على سلاسل أغلبها أحد هذين النوعين يكون جزيء البروتين طويل ورفيع عادة ويسمى بروتين ليفى fibrous protein.

يعتبر البروتين الليفى عادة من البروتينات التركيبية والمسئولة عن تركيب الخلية والأنسجة والكائنات الحية. بعض أمثلة البروتينات التركيبية الكولاجين collagen وهو عبارة عن بروتين الغضاريف والعظام والخيوط التى تصل العضلات بالعظام وبروتين الإيلاستين elastin وهو بروتين الجلد. بعض البروتينات غير قابلة للذوبان فى الماء ومثال ذلك بروتين الشعر والحريز fibroin.

والعكس صحيح فى حالة البروتين الحبيبي حيث أنه يحتوى على التراكيب حلزون ألفا وتراكيب بيتا أى رقائق بيتا  $\beta$ -sheets وهى تكون قصيرة وتتداخل بطريقة مبعثرة فى مناطق أو أجزاء حلزونية عشوائياً أى مناطق عشوائية الحلزون وتلتحم أو تلتصق هذه الأجزاء بواسطة تفاعلات عديدة بين خيوط السلسلة الواحدة وينتج عن هذه التفاعلات تراكيب مندمجة كروية إلى شبه كروية. عادة يكون البروتين الحبيبي هو البروتين catalytic الذى يقوم بعمل التفاعلات catalytic مثل الإنزيمات والبروتين التنظيمى للخلية regulatory تتميز البروتينات بأنها محددة الشكل والتركيب ولكنها قابلة للتغير وفقد شكلها a well defined but deformable structures. أجزاء أو قطع كبيرة من العمود الفقري لعدد الببتيدات المكونة للبروتين الحبيبي المثالى عبارة عن حلزون ألفا ويلتف وينحنى ويتداخل بدرجة شديدة هذا الجزيء عادة أجزاء من حلزون ألفا الصلب تتبادل مع أجزاء حلزونية مرنة عشوائية الحلزونة والتى تسمح بإتحاء السلسلة بدون ضغط ميكانيكى زائد.

أجزاء عديدة من السلسلة والتي تكون على أبعاد طويلة نسبياً أى بعيدة عن العمود الفقرى لسلسلة عديد الببتيدات تكون أجزاء قصيرة متوازية وغير متوازية (معاكسة) من تراكيب بيتا ونتيجة لذلك التراكيب جزئياً مسئول عن طي العمود الفقرى. يسمى كل من حلزون ألفا وتركيب بيتا بالتراكيب الثانوى للبروتين secondary structures.

وعندما يحدث إنطواء وطي زائد للعمود الفقرى يسمى التركيب الثالثى للبروتين tertiary structure وتسمى سلسلة الأحماض الأمينية الخام بالتركيب الإبتدائى للبروتين primary structure. ينشأ التركيب الثانوى نتيجة لتكوين روابط إيدروجينية بين مجاميع الببتيدات بينما ينشأ التركيب الثالثى من حلزون ألفا وتركيب بيتا مع حدوث كثير من التفاعلات الجانبية للسلسلة أو فى السلاسل عديدة الببتيدات. يتوقف التركيب الثالثى للبروتين على وجود خمسة أنواع من التفاعلات أى يتحكم فى حدوث التركيب الثالثى خمسة أنواع من التفاعلات وهى كما يأتى (شكل ٤٢).

١ - تجمع الأجزاء الكارهة للماء فى مجاميع hydrophobic clustering فى أجزاء السلاسل الجانبية المكونة من الأيدروكربونات للأحماض الأمينية فينيل ألانين وليوسين وأيزوليوسين وفالين. وتعتبر هذه الحالة من العوامل الهامة بل أهم عامل فى ثبات السلسلة والجزىء.

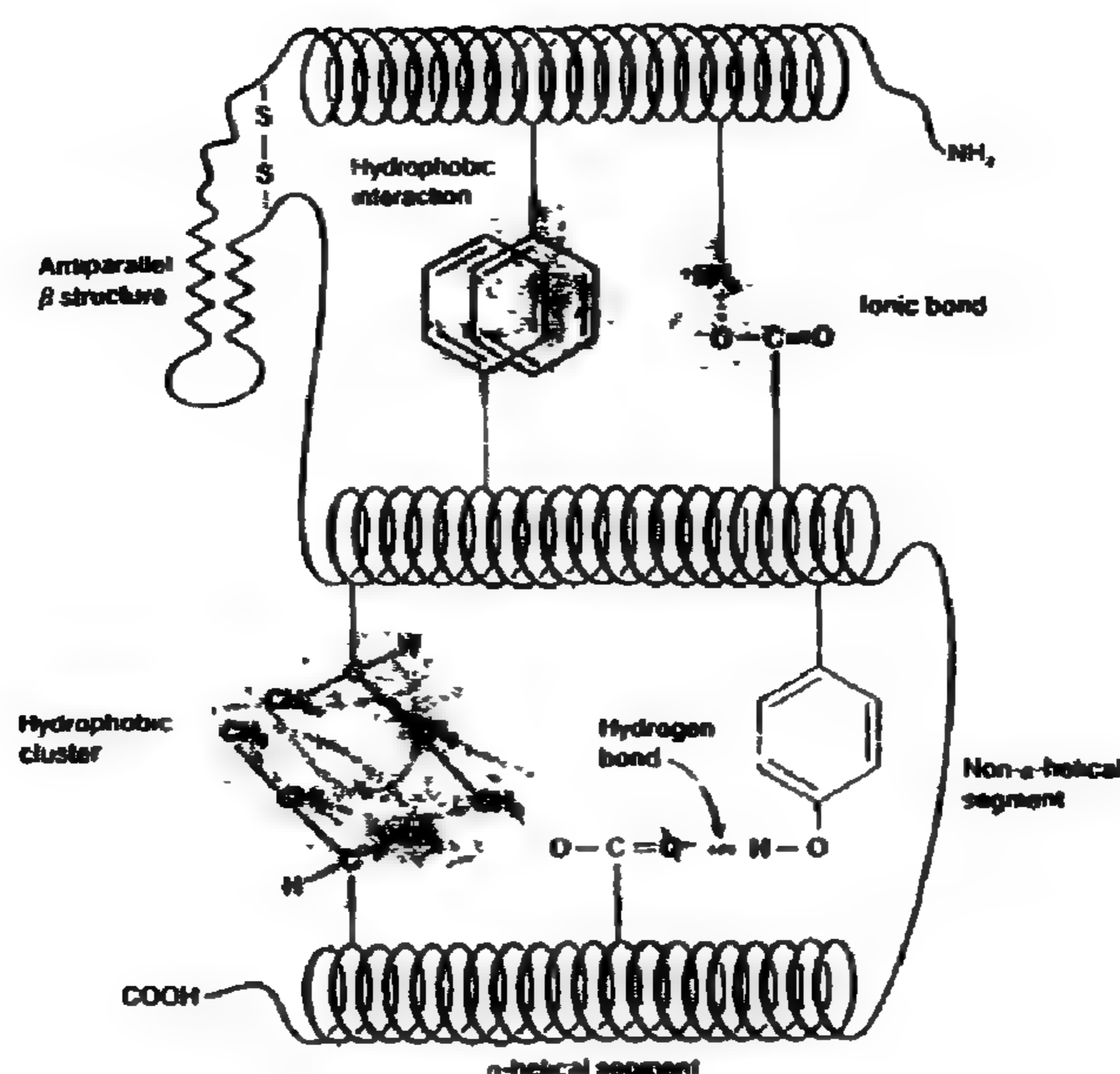
٢ - روابط أيونية ionic bonds بين المجاميع المختلفة الشحنة فى السلسلة الجانبية أى سالب وموجب.

٣ - روابط إيدروجينية hydrogen bonds بين مجموعة الإيدروكسيد فى التيروسين ومجموعة الكربوكسيل فى الأسبارتك والجلوتاميك.

٤ - قوى فان درفالس van der Waals Forces والتي ينتج عنها تفاعلات معينة بين مجاميع من الأحماض الأمينية والتي قد تكون قريبة من بعضها أو غير قريبة فى سلسلة عديد الببتيدات.

٥ - التعاون بين الأيونات المعدنية لتكوين تراكيب معقدة بين مجاميع الأمينات والإيدروكسيد والكربوكسيل والنيتروجين الموجود فى تركيب حلقى ring nitrogens وأزواج مجاميع SH أى السلفهيدريل.





شكل ٤٢ : شكل إفتراضى لبروتين حبيى به تفاعلات عديدة مختلفة للسلسلة الجانبية.

يتضح مما سبق أن هذه العوامل هى التى تحدد شكل جزئ البروتين وعامة يمكن التعليق على ما سبق فيما يأتى:

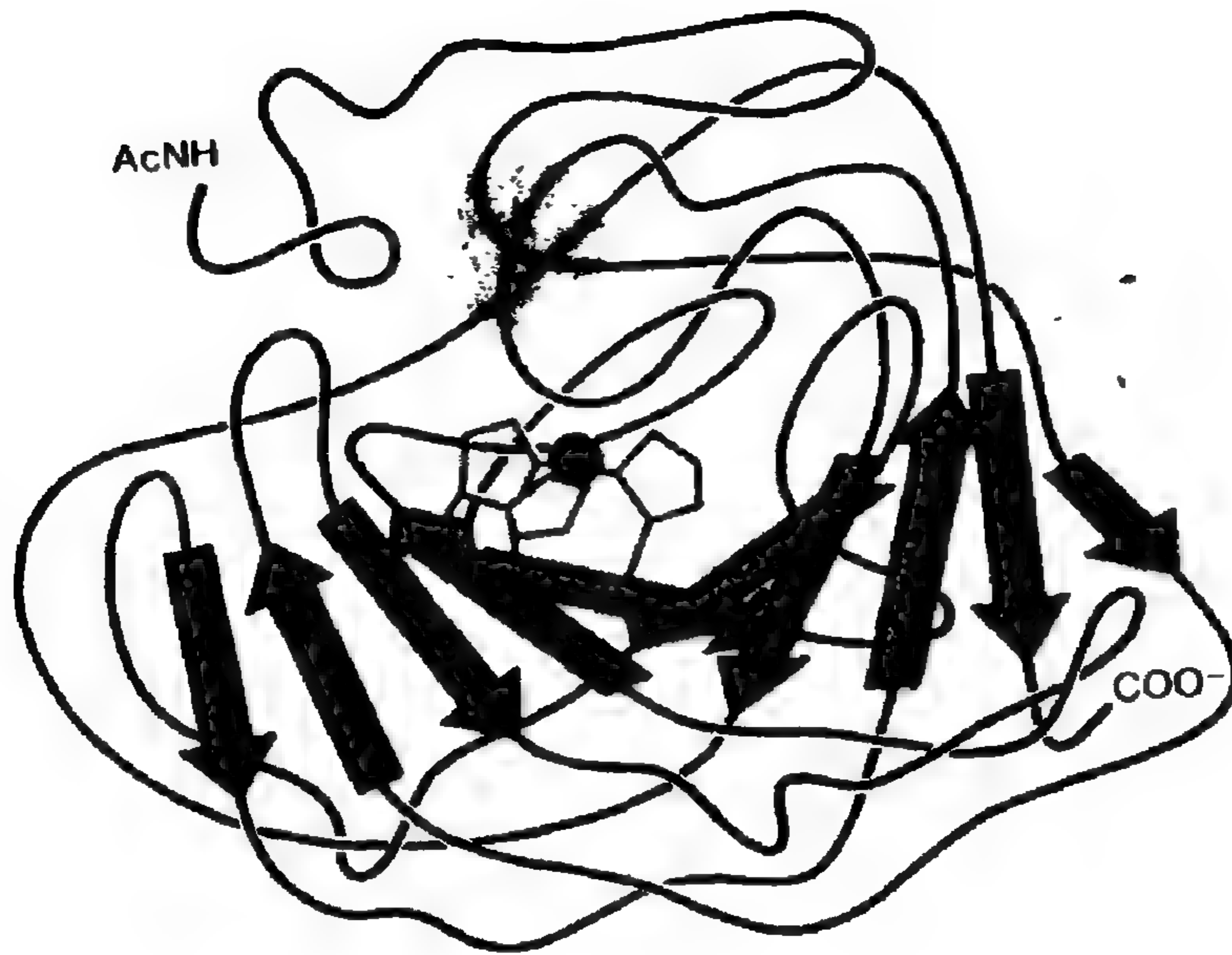
١ - جميع التفاعلات السابقة، عدا التنافر بين الشحنات المتماثلة، يسبب ضم الأحماض الأمينية مع بعضها وحتى المتباعدة عن بعضها.

٢ - تقرب الروابط الإيدروجينية بين الأحماض الأمينية المتباعدة أحياناً، ولكن عادة تسبب الرابطة الإيدروجينية الواحدة تغير طفيف مناسب فى وضع أى موضع الأحماض الأمينية.

٣ - يسبب كلا من حلزون ألفا وتركيب بيتا وجود أجزاء صلبة وشريطية فى العمود الفقرى لعدد الببتيدات.

يوضح تركيب إنزيم carbonic anhydrase، وهو إنزيم يتكون بالطبع من البروتين ويمكن توضيح تركيبه من حيث شكل ثلاثى الأبعاد three-dimensional

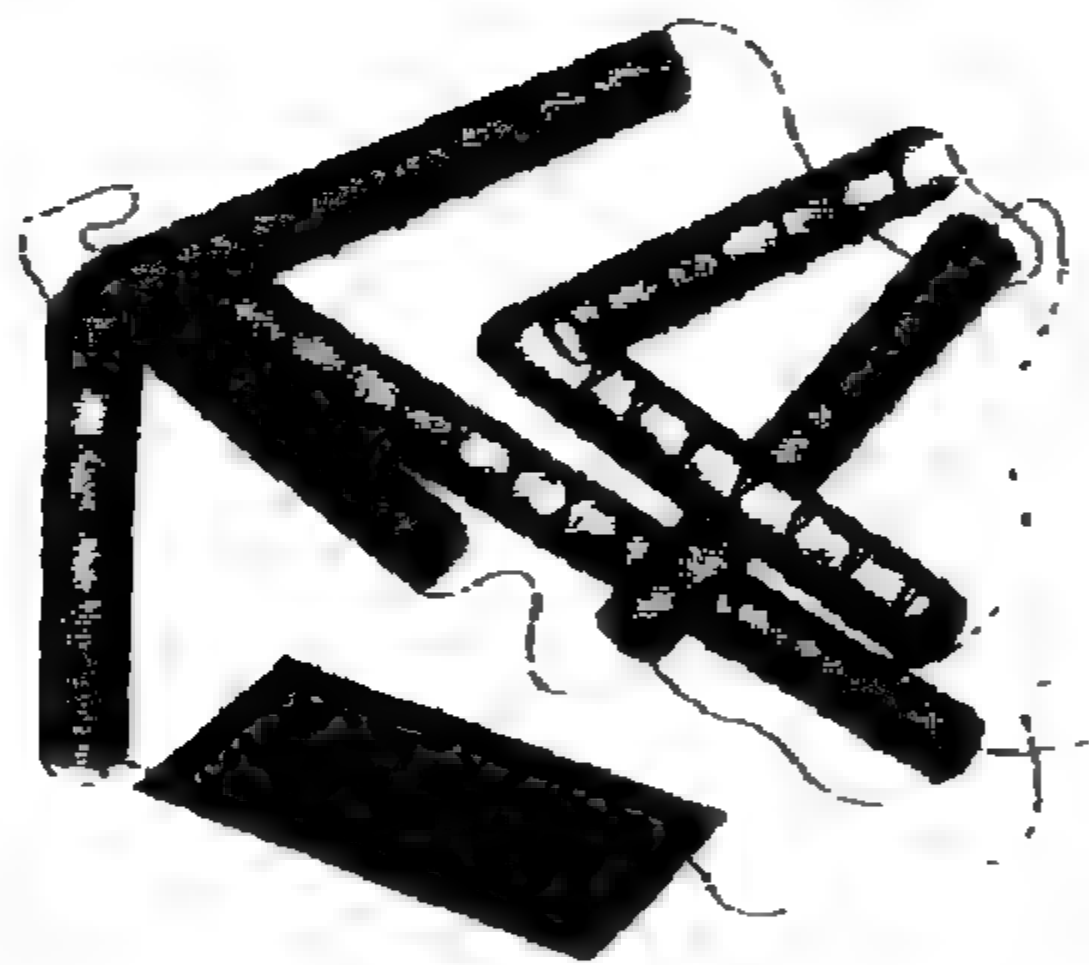
structure فهو يحتوى على تركيب بيتا ومجموعة من أجزاء كارهة للماء وثلاثة أحماض أمينية مرتبطة تعاونياً أى برابطة تعاونية coordination bond مع أيون معدنى (شكل ٤٣).



شكل ٤٣ : تركيب ثالثى لإنزيم carbonic anhydrase فى الإنسان. يوضح ثلاثة جزئيات هستدين مرتبطين مع أيون زنك فى الموقع النشط active site. خيوط Strands تركيب بيتا والتى تسمى أيضاً رقيقة بيتا beta sheet (الجمع رقائق بيتا β-sheets).

ترسم على هيئة أسهم من مجموعة الأمينو إلى الأطراف الكربوكسيلية. لاحظ twisting رقائق بيتا. الدائرة عبارة عن تجمعات أى مجاميع cluster من الأجزاء الكارهة للماء a hydrophilic cluster.

بالرغم من أن تركيب جزئ البروتين ثلاثى الأبعاد قد تم إكتشافه منذ ما يزيد على ثلاثون عامًا إلا أن التعرف على التركيب الدقيق لجزيء البروتين لم يتم معرفته إلا حديثًا حيث أن العمل فى ذلك كان بطئ وصعب ومتعب ودقيق. حديثًا تم التعرف على ما يزيد عن ٣٠٠ بروتين. وقد إتضح أن حلزون ألفا وتركيب بيتا فى البروتين مرتبة فى مجاميع تباديل بسيطة simple combinations (شكل ٤٤) وذلك بترتيب وأنظمة geometry هندسية معينة تسمى هذه الترتيبات والأنظمة الهندسية المعينة باسم motifs وهى موجودة فى كثير من البروتينات. ولذا يمكن وصف جزئ البروتين الآن على أنه يتكون من مجموعة من موتفس a set of motifs.



شكل ٤٤ : تقوية جزئ البروتين بواسطة  $\alpha$ -helix ورقائق بيتا.

بعض الموتفس motifs متخصصة لأداء وظائف معينة مثل التفاعل مع بعض الجزيئات الغير بروتينية مثل مرافقات الإنزيمات أو الأحماض النووية. بينما وظائف أخرى للموتفس وهى أنها توجد كجزء من تجمعات لجزيئات كبيرة. طى بعض الموتفس الخاصة يحتاج إلى تتابع خاص معين من الأحماض الأمينية وهى فى حالة التركيب الإبتدائى primary structure ولذلك فإن وجود أحد أو واحد من هذا التتابع المعين للأحماض الأمينية فى البروتين يمكن أن يكون دليل هام وكشاف لوظيفة البروتين.

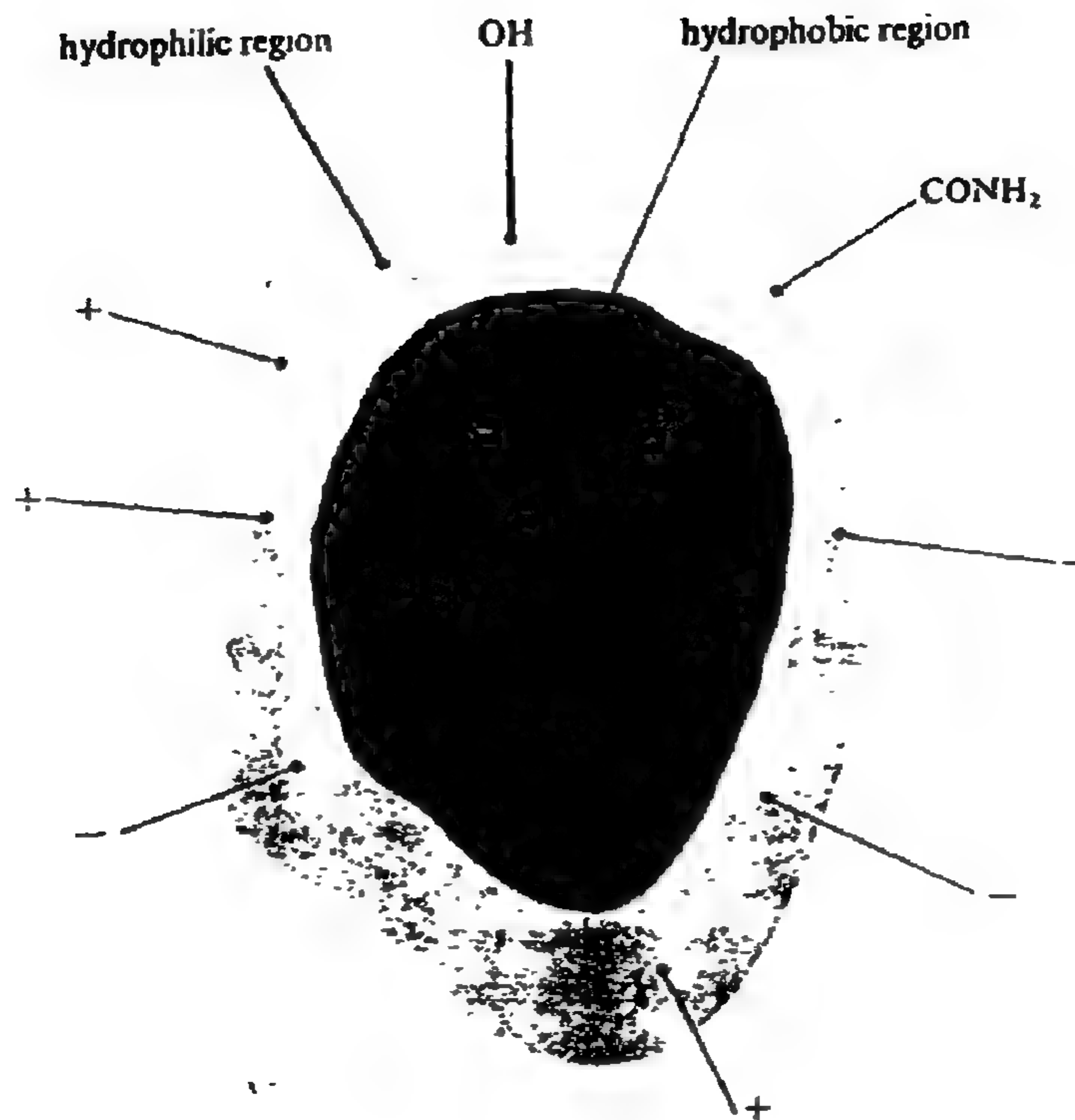


## البروتينات ذات تحت الوحدات:

## Proteins with Subunits

تلتوى سلسلة عديد الببتيدات بحيث أن الجانب الغير قطبي non-polar side يكون لداخل أى بعيد عن الارتباط بالماء (شكل ٤٥) ولكن من النادر أن يحدث ذلك. تكون الأحماض الأمينية الغير قطبية الموجودة عن السطح مجايع لتقليل سطح التلامس مع الماء. وفي حالة سلسلة عديد الببتيدات التى لها منطقة كبيرة من المجاميع الكارهة للماء يمكن أن تقلل من تلامسها مع الماء بالتزاوج أو بالإزدواج pairing من منطقة أخرى بها مجاميع كارهة للماء لجزيء آخر من عديد الببتيدات. ولذلك فإذا احتوى جزيء عديد الببتيدات على مناطق كارهة للماء متباعدة وفى وجود جزيئات أخرى من عديد الببتيدات مشابهة لهذا الجزيء قريبة منه إن هذه المجاميع الكارهة للماء تتجمع مع بعضها بين الجزيئات المختلفة مسببة تقليل مساحة السطح المعرض للماء وفى هذه الحالة يسمى البروتين أنه يتكون من تحت وحدات متماثلة identical subunits. وهذه الحالة من تحت الوحدات المتماثلة تحدث عندما يكون عدد تحت الوحدات الشائع قليل نسبياً اثنين أو ثلاثة أو أربعة أو ستة ولكن يوجد حالة بروتينات عديدة تحت الوحدات multisubunit system وتتميز هذه الحالات بأن لها مميزات فريدة وهى أن هذه الأنواع من البروتين يمكن بسهولة وبكفاءة عالية وبسرعة تقوم بنشاط معين أو بعمل معين أو بتفاعل معين أو بوظيفة معينة كما أنها بسرعة تتوقف عن هذا العمل أو التفاعل أو الوظيفة ثم تعاود ذلك مرة أخرى وهكذا يمكن أن يحدث تتابع من توقف وعمل وهكذا يتكرر باستمرار efficiently and rapidly switched on and off. ولكن كيف يحدث ذلك؟ يحدث ذلك نتيجة لما يسمى بالتأثيرات المختلفة التجسيم allosteric effects. يمكن أيضاً أن يكون البروتين متكون من عديد تحت الوحدات المتماثلة identical sub units أو من عديد تحت الوحدات الغير متماثلة non-identical sub units. يحدث الأخير نتيجة لتجميع جزيئات مختلفة من عديد الببتيدات. ومثال لذلك إنزيم RNA polymerase والذى يقوم ببناء RNA فإنه يتكون من خمسة تحت وحدات وجد أن أربعة منها مختلفة.

وتركيب البروتين المكون من تحت وحدات يسمى عادة التركيب الرباعي  
-quaternary structure



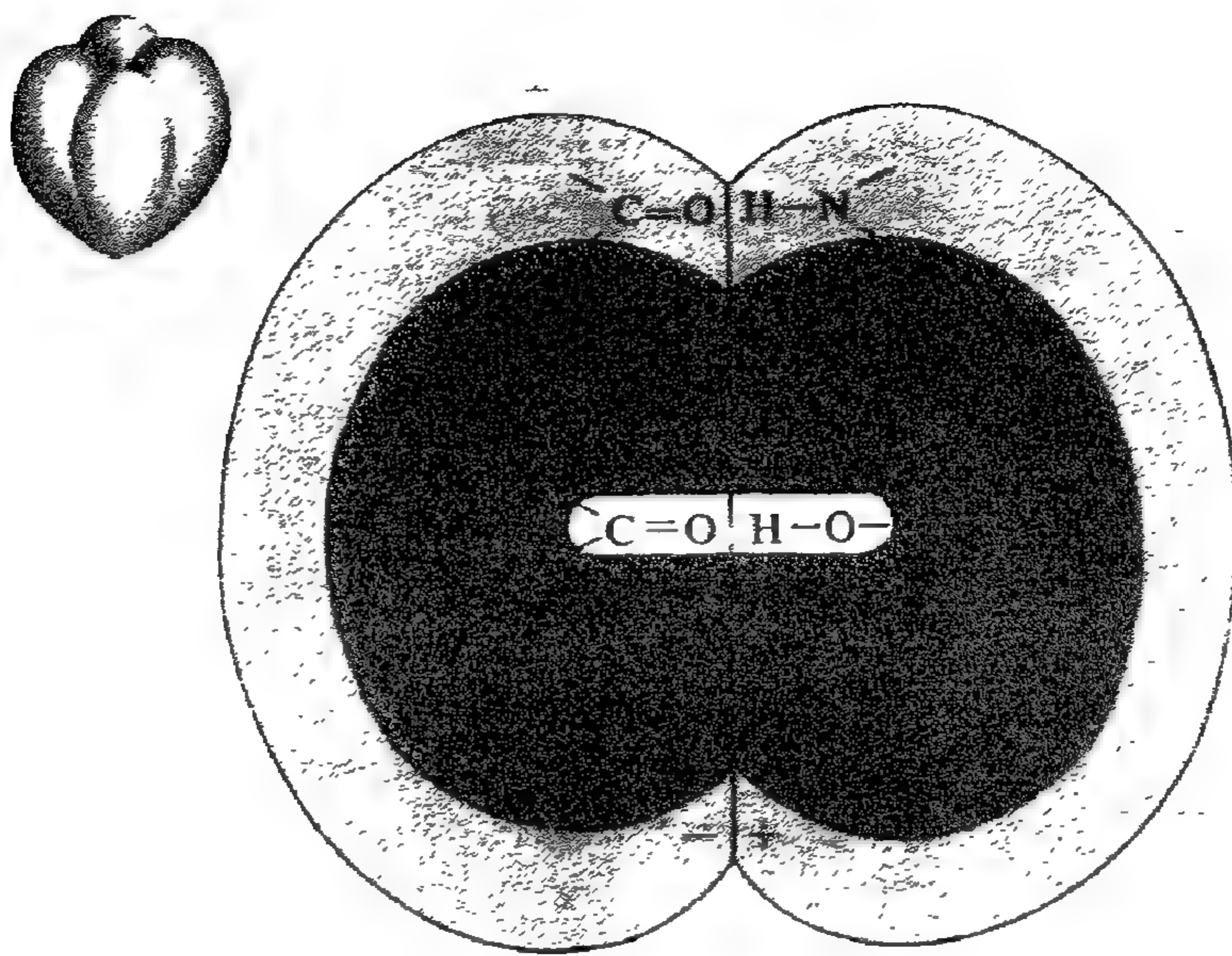
شكل ٤٥: تركيب جزيء بروتين مثالي يوضح تكوينه لجزيئين أحدهما داخلي كاره للماء hydrophobic، والآخر خارجي محب للماء hydrophilic.

### التركيب الرباعي للبروتين:

#### Quaternary Structures of Protein:

سبق الحديث وتعريف التركيب الرباعي للبروتين فقد يكون عدد تحت الوحدات أربعة tetrameric structure كما في الهيموجلوبين (شكل ٤٦). يوجد في الشكل جزيء بروتين رباعي تحت الوحدات يوضح طريق إتصال والتفاعل بين تحت وحدتين two monomers (شكل ٤٦). ومثلاً في حالة إنزيم asparate

transcarbamylase فإنه يتكون من عديد من تحت الوحدات polymeric وهي ١٢ تحت وحدة (شكل ٤٧). توجد بعض الروابط شائعة لعمل إرتباط بين شرائط الببتيدات المتقاربة لتكوين التركيب الرباعي للبروتين (شكل ٤٨).



شكل ٤٦: على اليمين جزئ الهيموجلوبين رباعي الوحدات tetrameric. على الشمال جزئ بروتين أيضاً رباعي تحت الوحدات tetrameric. في الوسط قطاع في تحت وحدتين يوضح طريقة الإتصال بينهما على السطح الفاصل بينهما. الجزء الداخلي كاره للماء (غامق) والجزء الخارجي (فاتح) محب للماء.

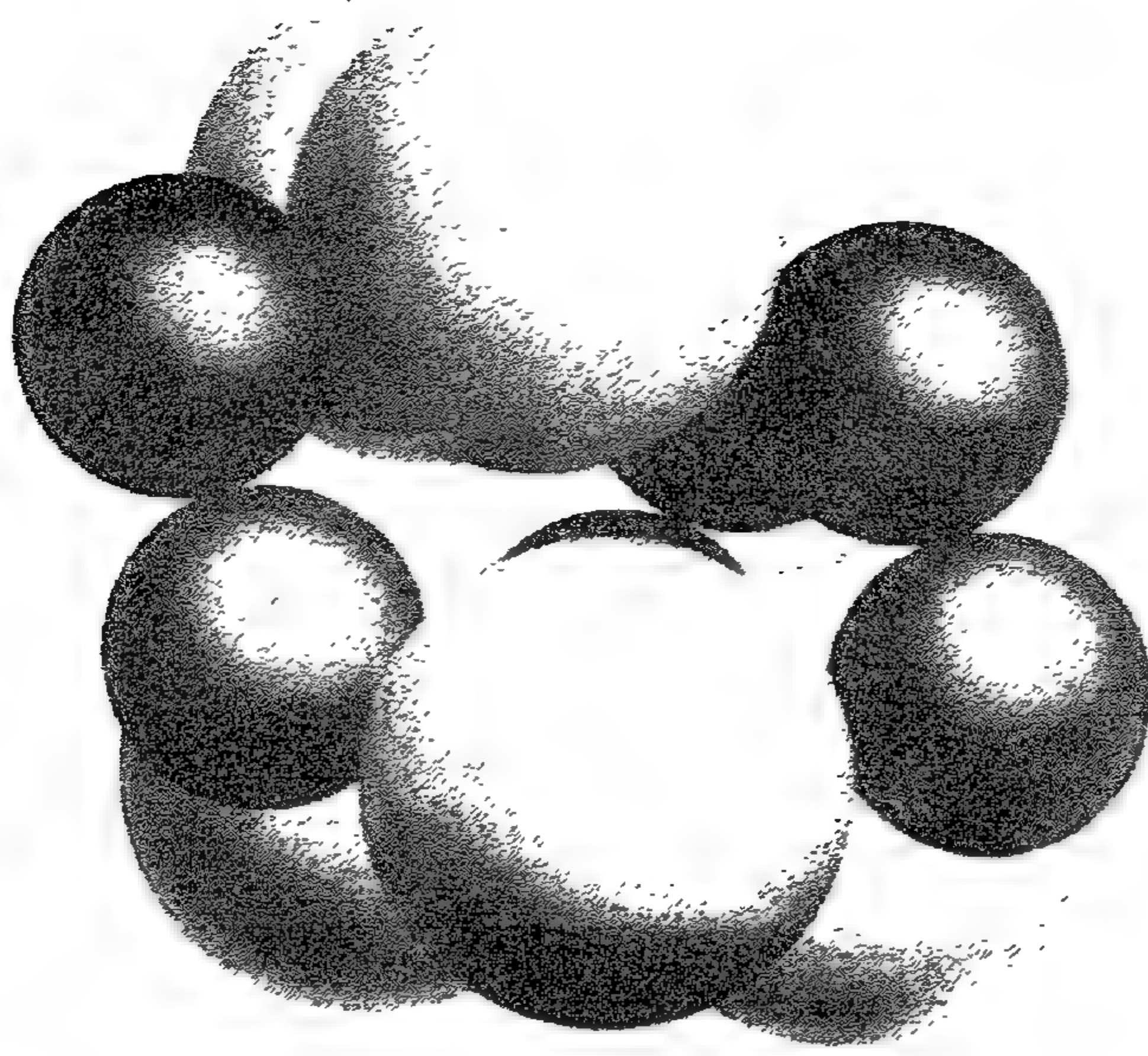
## التأثيرات المختلفة التجسيم:

### Allosteric effects:

وهي إختلاف تحت الوحدات في أداء وظيفتها فنجد في حالة إنزيم aspartate transcarbamylase توجد ٦ وحدات صغيرة الحجم (غامقة اللون) وهي عبارة عن تحت وحدات تنظيمية regulatory subunits وستة وحدات كبيرة الحجم (فاتحة اللون) وهي عبارة عن تحت وحدات وظيفية مؤدية للوظيفة catalytic subunits



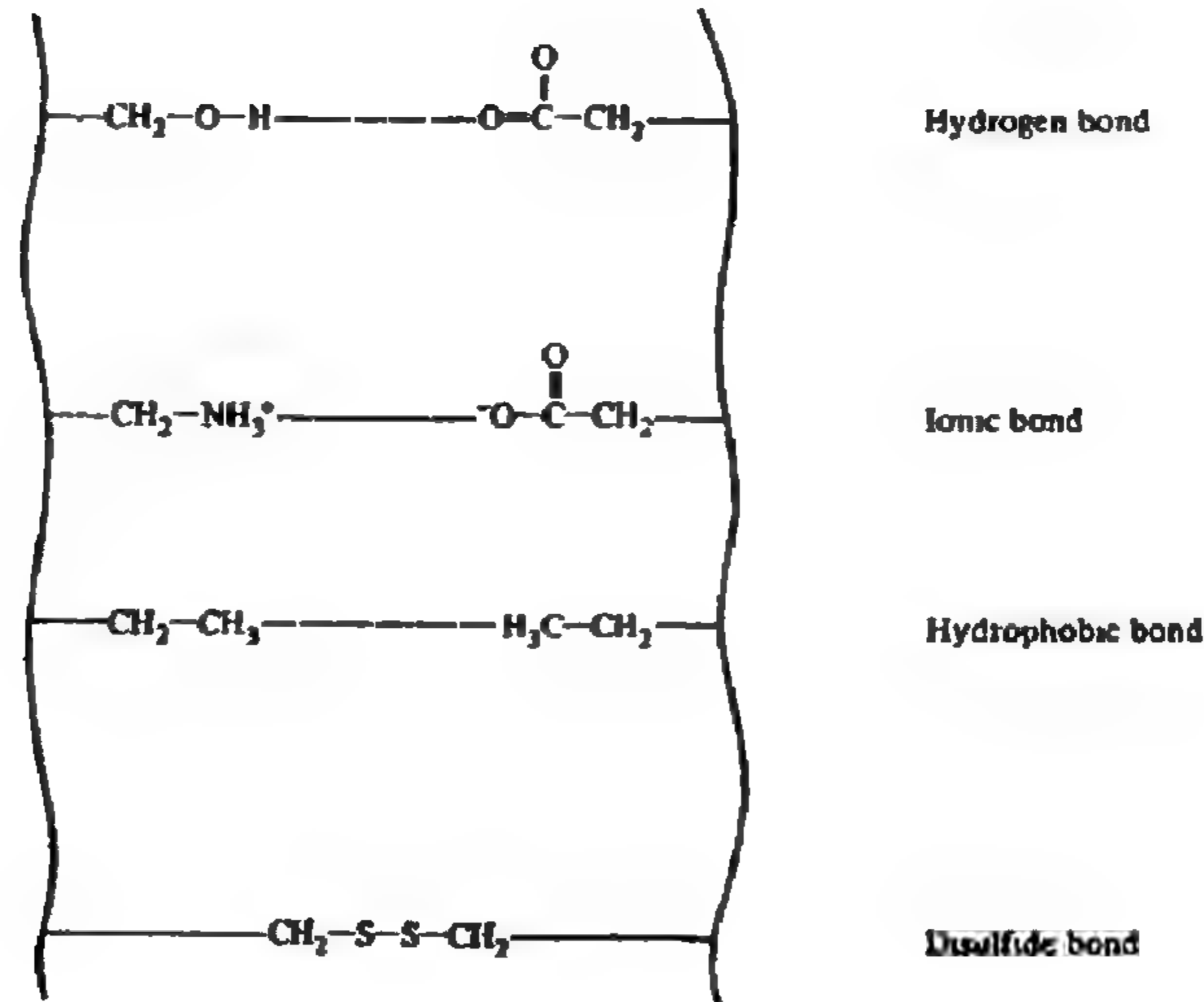
(شكل ٤٧). الإنزيم السابق عبارة عن allosterically controlled enzyme موقع  
allosteric site هو عبارة عن موقع إرتباط على سطح الإنزيم.



شكل ٤٧: تحت وحدات إنزيم aspartate transcarbamylase تحت الوحدات  
الصغيرة الغامقة regulatory subunits وتحت الوحدات الكبيرة الفاتحة catalytic  
subunits هذا الإنزيم allosterically controlled enzyme.

وهو يختلف تمامًا عن الموقع النشط أو الفعال active site. في حالة إنزيم  
allosteric فإن إلتحام جزيء منظم مع regulatory molecule مع الموقع allosteric  
يغير تمامًا من شكل الإنزيم وذلك بمساعدته على الإلتحام بمادة التفاعل في الموقع  
النشط أو يمنع الإنزيم من الإلتحام بمادة التفاعل. تبعًا لأبحاث Monod, Jacob,

Changeux وجد أن كثير من بروتينات الإنزيمات لها مواقع sites خلاف المواقع النشطة active sites أى catalytic sites أى active catalytic sites ترتبط مع هذه المواقع جزيئات معينة صغيرة small metabolite molecules وتسمى هذه المواقع allosteric sites. ونتيجة لهذا الارتباط الأخير فإنها تؤثر على تفاعلات أو تفاعل الإنزيم. وهذه الجزيئات الصغيرة التى تؤثر على تفاعلات الإنزيم وحركياته kinetics تسمى effectors. هذه effectors التى تزيد من سرعة التفاعل تسمى positive effectors أى effectors موجبة والتى تقلل من سرعة التفاعل تسمى negative effectors أى effectors سالبة. يعتقد أن الالتحام بين effector وموقع allosteric يغير من شكل وتركيب conformation البروتين وهكذا يؤثر ذلك على تفاعل الإنزيم بين الموقع النشط ومادة التفاعل أو cofactor.



شكل ٤٨: حالات وأنواع مختلفة للروابط التى يمكن ان تحدث بين شرائط الببتيدات المتقاربة والتى عن طريقها يتم تكوين التركيب الرباعى للبروتين.

عوامل النسخ وأصبع الزنك والبروتينات المرتبطة بدنا:

## Transcription factors and Zinc finger

أصبع الزنك عبارة عن بروتين خاص يلتحم بدنا وخاصة بعوامل النسخ

transcription factors (عوامل النسخ عبارة عن أى مجموعة من البروتينات تكون قادرة على التأثير على درجة إرتباط إنزيمات بلمرة رنا RNA polymerases مع جزيء دنا أثناء عملية النسخ. يكون التأثير على درجة الإرتباط بالنقص أو الزيادة أى يزيد من الإرتباط أو يقلل من الإرتباط. عوامل النسخ لها القدرة على الإرتباط بجزئ دنا). (تحتوى عوامل النسخ على finger domains والتي توجد عادة فى تتابعات مكررة تسمى بالعقد عديدة الأصابع multifinger loops domain) عبارة عن وحدة وظيفية من بروتين ثالثى tertiary structure. تتكون من سلاسل من أحماض أمينية منطوية لتكوين حلزونات ألفا  $\alpha$  helices ورقائق بيتا  $\beta$  sheets لتكوين بروتين حبيبي globular protein. الدومينات المختلفة domains تلتحم ببعضها بواسطة سلاسل مستقيمة نسبياً من عديد الببتيدات لتكون جزئ البروتين. هذه الدومينات تسمح بدرجة معينة من الحركة فى تركيب البروتين. (finger domain عبارة تركيب أسبعة الشكل يتكون فى البروتين عندما تتحد سلاسل من الأحماض الأمينية مع ذرة معدن).

أصبع الزنك يتكون من سلسلة مطوية من الأحماض الأمينية على هيئة أصبع (صابع) وفى قاعدة هذا الأصبع يوجد جزيئين من الستين وجزيئين من الهستدين. وهذه الجزيئات الأربعة الأخيرة تلتحم مع أيون زنك مفرد single zinc ion فى ترتيب أو نظام رباعى الأوجه tetrahedral array. يتفاعل الأصبع الواحد مع حوالى أزواج من القواعد فى جزيء الحامض النووى. أصبع الزنك يرتبط مع دنا ويمكن أن يتواءم مع البروتينات التى ترتبط مع رنا مثل RNA-directed RNA polymerase.

تحتوى DNA-binding proteins على أصبع الزنك وسوستة وأبزيم الليوسين leucine zipper (وهذا الأخير يمكن أن يوجد أيضاً فى بروتينات أخرى). سوستة وأبزيم الليوسين يتكون من بروتين به مجموعة من أربعة أو خمسة جزيئات ليوسين تكون مكررة كمجموعة باستمرار بعد كل سبعة أحماض أمينية فى التركيب الإبتدائى للبروتين. فى حالة التركيب الحزوني لدينا فإنها تكون صف أو خط أو سلسلة من



اليوسين على أحد جانبي الحلزون. ومع وجود حلزونين من هذا النوع مواجهين لبعضهما *two such helices alongside each other* فإن صفين اليوسين يمكن أن يتداخلا *interdigitate* مثل أبزيم السوستة وهذا التركيب يكون وصلة ثابتة بين الحلزونين.

تحتوى *DNA-binding proteins* أيضاً بروتينات *helix-loop-helix* (helix-turn-helix) حلزون عقدة حلزون، وهى تتكون من إثنين من حلزون ألفا *two alpha-helices* متصلين ببعضهما بواسطة جزء قصير غير حلزوني يسمى *turn*. أحد هذين الحلزونين يتعرف على تتابع خاص من النيوكليوتيدات فى جزيء دنا ويوجد فى شق *groove* فى جزيء دنا ثنائى الحلزون، بينما الحلزون الآخر يحفظ ثبات وإرتباط حلزوني دنا.

البروتينات المرتبطة بدنا *DNA-binding proteins* وهى بروتينات قادرة على الالتصاق مع دنا فى بدائيات النواة وحقيقيات النواة وهى تعمل كمنشطات *activators* أو مثبطات أو كابحات *repressors* عند تعبير الجين عن وظيفته *gene expression* وذلك بالتحكم فى إلتحام إتريم بلمرة رنا مع دنا أثناء عملية النسخ وعلاوة على ذلك فإن هذه البروتينات لها دور فى تضاعف أى تكرارية دنا وذلك بأن تلتحم مع النيوكليوتيدات فى شريط أو خيط أو حلزون مفرد لدنا والذى يستخدم كأصل *tempelate* ويكون غير ملتوى أى غير ملفوف *unwound* وبذلك تساعد على ثباتها على هذا الشكل وتمنعها من الإلتواء مرة أخرى. والهستونات لا تدخل ضمن مجموعة هذه البروتينات. وهكذا فإن البروتينات المرتبة بدنا تتكون من إصبع الزنك وسوستة وأبزيم اليوسين وحلزون عقدة حلزون. تعتبر عوامل النسخ من البروتينات المرتبطة بدنا.

البروتينات المرتبطة بدنا *DNA-binding proteins* وهى بروتينات قادرة على الالتصاق مع دنا فى بدائيات النواة وحقيقيات النواة وهى تعمل كمنشطات *activators* أو مثبطات أو كابحات *repressors* عند تعبير الجين عن وظيفته *gene expression*

وذلك بالتحكم فى إلتحام إنزيم بلمرة رنا مع دما أثناء عملية النسخ. وعلاوة على ذلك فإن هذه البروتينات لها دور فى تضاعف أى تكرارية دنا وذلك بأن تلتحم مع النيوكليوتيدات فى شريط أو خيط أو حلزون مفرد لدنا والذى يستخدم كأصل template ويكون غير ملتوى أى غير ملفوف unwound وبذلك تساعد على ثباتها على هذا الشكل وتمنعها من الإلتواء مرة أخرى. والهستونات لا تدخل ضمن مجموعة هذه البروتينات. وهكذا فإن البروتينات المرتبطة بدنا تتكون من إصبع الزنك وسوستة وأبزيم الليوسين وحلزون عقدة حلزون. تعتبر عوامل النسخ من البروتينات المرتبطة بدنا.

## **الإنزيمات:**

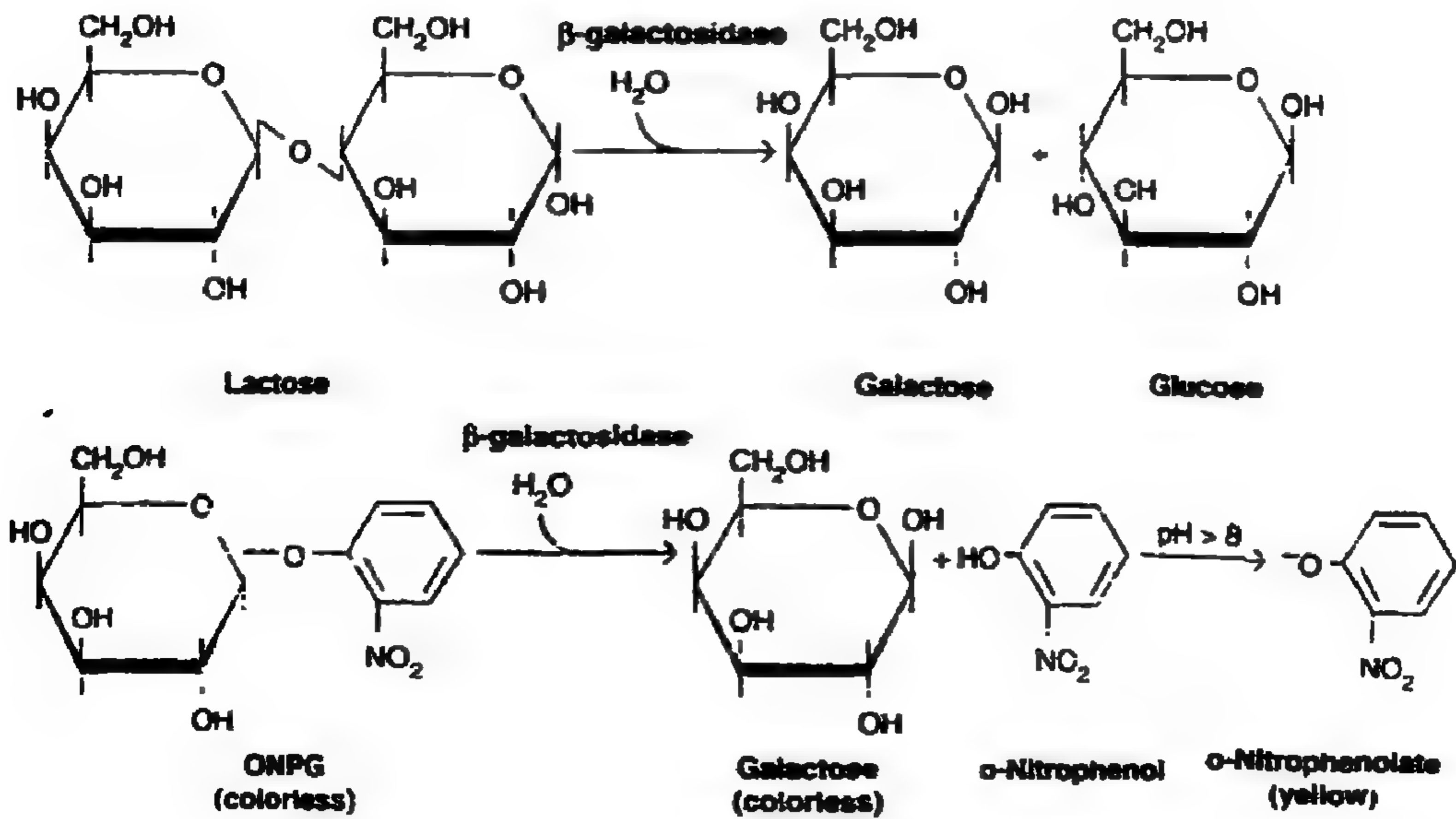
### **Enzymes**

تعتبر الإنزيمات هى عبارة عن عوامل مساعدة بيولوجية biological catalysts. قدرة الإنزيمات فى هذا الصدد تفوق جميع العوامل المساعدة الصناعية أى الكيماوية man-made catalysts. يزيد الإنزيم سرعة التفاعل من  $10^1$  إلى  $10^{11}$  وبعض الإنزيمات تزيد سرعة التفاعل  $10^5$  مرة. الإنزيمات متخصصة جداً أى شديدة التخصص فى عملها حيث أن الإنزيم الواحد يتخصص فى عمل تفاعل معين واحد عادة، وأحياناً مجموعة من التفاعلات المتقاربة، ولذلك توجد إنزيمات كثيرة.

تعبّر عن الإنزيمات الجينات أى أن الجين الواحد أو أكثر متخصص فى تخليق إنزيم معين ولذلك يلزم جين أو أكثر معين لتخليق إنزيم معين (أبحاث Tatum, Beadle فى الخمسينيات وأوائل الستينيات على فطر *Neurospora*). وهكذا فإن قياس نشاط الإنزيم يعبر بطريقة جيدة عن وجود الجين الخاص به gene expression. توجد طرق عديدة لدراسة التفاعلات الإنزيمية ومنها طريقتين شائعتين وهى قياس اللون optical assays باستخدام أجهزة spectrophotometers وقياس درجة الإشعاع radioactivity assays. فى إختبارات قياس اللون للإنزيم أساسها مدى قدرة الإنزيم على إمتصاص الضوء عند طول موجة معين ومن أمثلة ذلك إنزيم بيتا جالاكتوز

سيديز  $\beta$ -galactosidase والذي يقوم بتحليل سكر اللاكتوز إلى جلوكوز وجالاكتوز، طبيعة التفاعل موضحة في الشكل (شكل ٤٩) والرابطة التي يكسرها الإنزيم موضحة في الرسم.

وللكشف والتعرف على هذا التفاعل وكسر الرابطة فإن مادة التفاعل هي مادة كيميائية تركيبية *o*-nitrophenyl galactoside واختصارها ONPG. هذا المركب يشابه سكر اللاكتوز في أنه له نفس الرابطة ولذلك فإن الإنزيم يعمل على هذه الرابطة ويحلل ONPG. الميزة في هذا التفاعل أن هذا المركب عديم اللون وعند تحلله يعطي سكر جالاكتوز و *o*-nitrophenol والمركب الأخير يتحول في pH أعلى من ٨ إلى *o*-nitrophenolate والذي يكون لونه أصفر غامق (شكل ٤٩)، وهكذا فإن نشاط الإنزيم يمكن التعرف عليه بتقدير تركيز أورثونيتروفينوليبت عند طول موجة ٤٢٠ نانومتر بدرجة تركيز اللون الأصفر بجهاز spectrophotometer.



شكل ٤٩: الشكل العام العلوى يوضح نشاط الإنزيم. والشكل السفلى يوضح نشاط الإنزيم  $\beta$ -galactosidase على ONPG وتكوين اللون الأصفر ليسهل الكف عن نشاطه بواسطة جهاز spectrophotometer عادى.



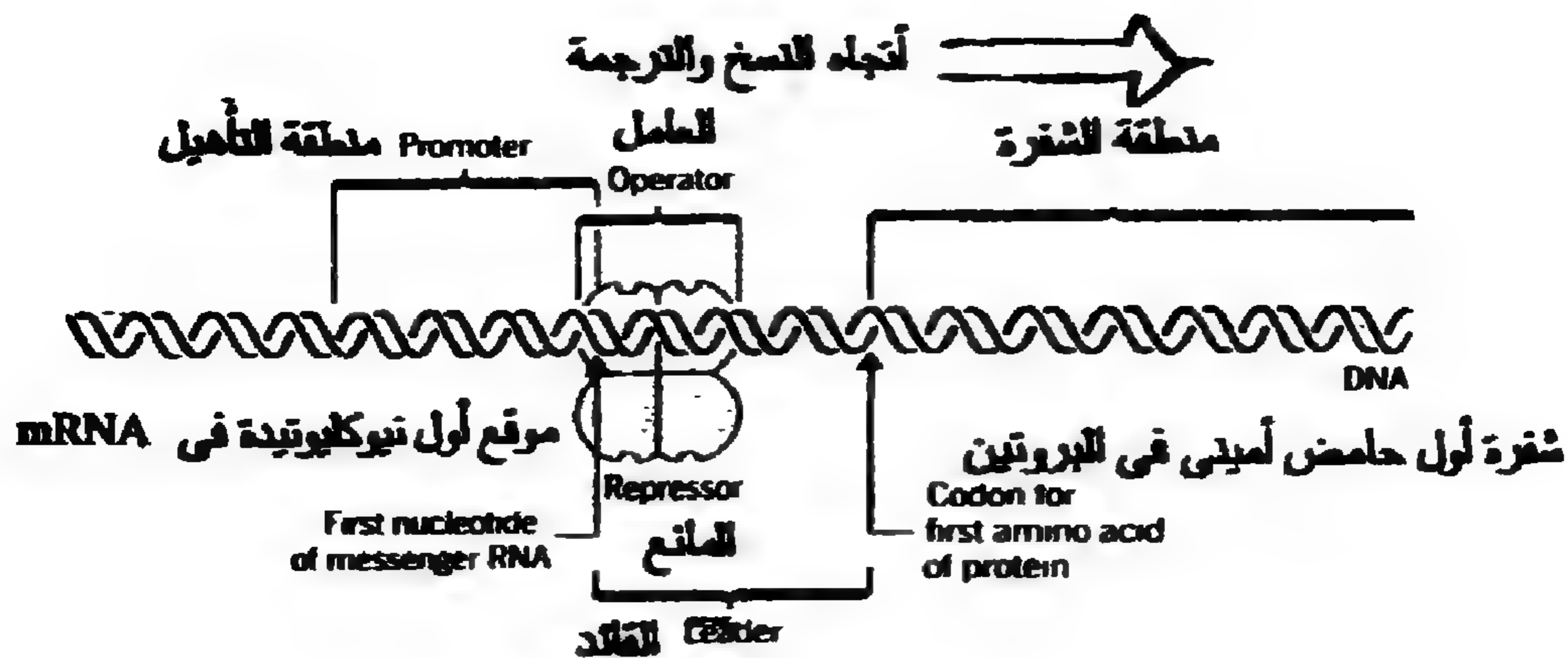
فى حالة إختبارات تقدير تركيز الإشعاع فإن مادة التفاعل المشعة تضاف لمخلوط التفاعل ويمكن قياس تركيز الإشعاع فى ناتج التفاعل أو قياس درجة فقد الإشعاع فى بيئة التفاعل. توجد طرق عديدة لعمل هذه الإختبارات. وأحد أسس هذه الإختبارات بالنسبة للبروتينات ودنا و رنا يكون قياس درجة البلمرة والأحماض النووية وأن جميع البروتينات والأحماض النووية غير قابلة للذوبان فى ١ جزيئى من ترى كلورو حامض الخليك (TCA) trichloroacetic acid بينما الأحماض الأمينية والنيوكليوتيدات تذوب فى TCA. ومثال لذلك لقياس درجة تخليق البروتين فإنه يستخدم أحماض أمينية عددها عشرون حامض أحدها معلم أى بواسطة الكربون المشع ك ١٤ مع وجود إنزيمات مناسبة وعوامل منشطة factors لازم للتفاعل. وبعد مدة مناسبة من التفاعل يضاف TCA ثم يتم ترشيح المخلوط وغسله بواسطة TCA. الحامض الأمينى المشع يذوب فى TCA ويمر عبر ورقة الترشيح ويوجد فى الراشح ولكن البروتين يحجز على ورقة الترشيح. يمكن قياس درجة الإشعاع على ورقة الترشيح ومنها يستدل على تركيز البروتين ومعدل تخليقه نتيجة التفاعل. أى يستدل على سرعة التفاعل بدرجة الإشعاع.

### **إستخدام إنزيم اللاكتيز (بيتا جالاكتوسيديز) فى الهندسة الوراثية :**

لكى يتمكن مهندس الوراثة genetic engineer من تنظيم عملية إنتاج RNA يجب أن يتحكم فى كيفية البدء والانتهاى فى عملية الإنتاج حيث أنه إذا لم يمكنه كيف ومن أين يبدأ فستكون عملية إنتاج RNA مختلة وأيضاً إذا لم يمكنه كيف ومتى ينتهى من العملية فسيحدث إختلال فى إنتاج RNA. يمكن التحكم فى ذلك بواسطة طريقتين وهما المنع أو التثبيط repression والتوهين attenuation وقد تم دراسة هاتين الطريقتين بالتفصيل فى البكتيريا. وفيما يلى دراسة الحالة الأولى.

دراسة تحكم الجين فى الصفة عن طريقة إستخدام الموانع أو المثبطات

repressors أجريت على بعض الحالات ولكنها درست بكثرة فى حالة الإنزيمات المحللة للمركبات الغذائية التى تتكون داخل الخلية البكتيرية. تتميز هذه الإنزيمات المدروسة بأنها لا تنتج داخل الخلية البكتيرية إلا فى حالة وجود المركب الغذائى الذى تحلله substrate فى داخل الخلية البكتيرية. بمعنى أنه فى حالة عدم وجود المركب داخل الخلية البكتيرية لا يتكون الإنزيم. ومثال ذلك إنزيم لاكتيز داخل البكتيريا *E. coli*. وقد وجد أن الجين أو الجينات التى تتحكم فى الإنزيم تتوقف عن عملها وبالتالي لا ينتج الإنزيم فى حالة وجود نوع معين متخصص من البروتين يسمى المانع repressor والذى يرتبط بحلزونى DNA فى منطقة ملاصقة لبداية المنطقة الخاصة بالجين وبالتالي يمنع الجين من إظهار تأثيره. حيث أن وجود المانع يمنع إنزيم RNA polymerase من إداء عمله وبالتالي لا تتكون رسالة من الجين أى لا يتكون mRNA خاصة بهذا الجين والعكس صحيح عند توفر سكر اللاكتوز داخل الخلية البكتيرية فإن المانع يترك مكانه على الجين ويلتصق بالسكر ولذلك يصبح الجين قادر على عمل رسالة message ويصبح إنزيم RNA polymerase قادر على العمل فى منطقة الجين ودائماً يرتبط الإنزيم بالـ DNA فى منطقة قريبة من الجين تسمى منطقة التأهيل promoter. يتحرك الإنزيم من منطقة التأهيل إلى منطقة الجين ويتكون فى هذه المنطقة mRNA قصير يسمى القائد leader أى leader mRNA ثم يلى ذلك تكوين mRNA الخاص بمنطقة الجين والمكون لشفرات الجين ثم يلتصق mRNA بالريبوسومات لتكوين البروتين المكون لإنزيم اللاكتيز نتيجة لتكوين الإنزيم يتم تحليل سكر اللاكتو. بعدد تمام تحليل سكر اللاكتوز لا يجد المانع السكر ليلتصق به فينتقل ويرتبط مرة أخرى بالجين فى منطقة تسمى العامل operator وبذلك يمنع الجين من إظهار تأثيره (شكل ٥٠) أى أنه يمنع تكون الرسالة الخاصة بتكوين إنزيم اللاكتيز وبمعنى آخر يمنع تكوين mRNA الخاص بإنزيم اللاكتيز.

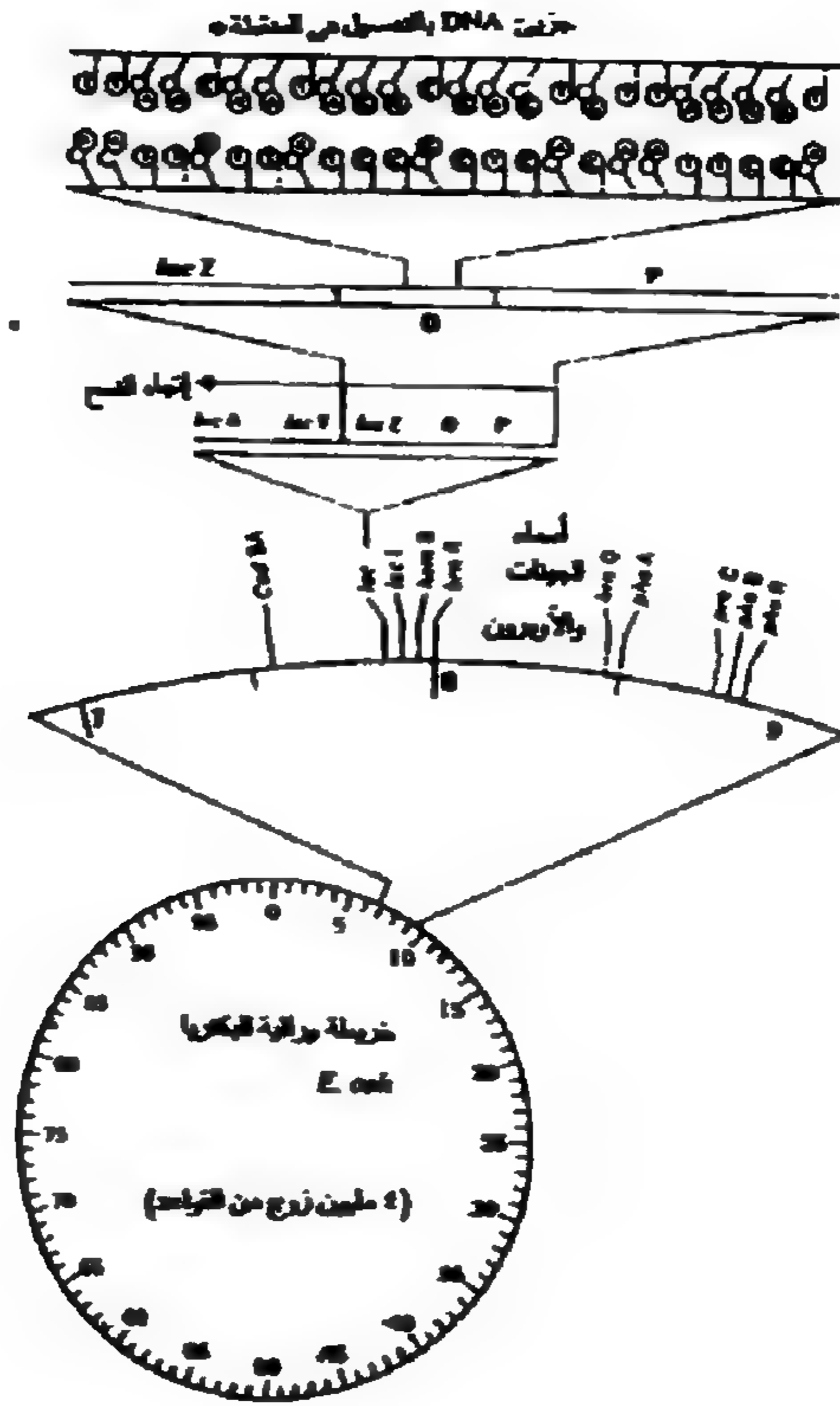


شكل ٥٠: التحكم في إبراز صفة الجين بواسطة gene expression repressor.

ومما هو جدير بالذكر أن لكل جين مانع خاص به وأيضاً منطقة تأهيل خاصة به. ولهذا النظام فائدة عظيمة للخلية حيث أنه يوفر للطاقة اللازمة لإنتاج الإنزيمات في عدم وجود مادة التفاعل substrate وحيث يكون إنتاج الإنزيمات غير مفيدة للخلية. هذه الإنزيمات التي تتميز بأنها تتكون فقط في وجود التفاعل تسمى بالإنزيمات التأقلمية adaptive enzymes ويوجد منها الكثير في الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا والفطريات والميكوبلازما. أحياناً تمنع مجموعة من الجينات قريبة من بعضها من إظهار تأثيرها بواسطة مانع واحد فقط فتسمى هذه المجموعة من الجينات أوبيرون operon. ومن أحسن الأمثلة لذلك حالة سكر اللاكتوز في خلية البكتيريا حيث أنه يوجد ٣ جينات متقاربة هي التي تتحكم في التحول الغذائي لسكر اللاكتوز وتخليق إنزيم اللاكتيز ويسمى الـ operon في هذه الحالة بإسم lac. والجينات الثلاثة هي lac Z، lac Y، lac A مترابطة بجانب بعضها على الكروموسوم البكتيري بالقرب من الموقع ٨ للخريطة الكروموسومية 8 near map position. يبدأ عمل إنزيم RNA polymerase من المكان P ويتجه ويستمر في عمله حتى نهاية الجين lac A. أي أن الإنزيم يتوقف عمله تماماً بعد إتمام مروره على الجين lac A. وعندما يرتبط مانع أوبيرون lac في منطقة الجين lac 1 مع lac operator وهو المنطقة O فإن عملية



نسخ mRNA تتوقف تماماً بالنسبة لهذه الثلاث جينات. ومما هو جدير بالذكر أن تتابع الـ nucleotides في هذه المنطقة من الكروموسوم البكتيري معروف تماماً كما أن تتابع nucleotides لهذا المانع معروف كما هو في الشكل (شكل ٥١).



شكل ٥١ : operons على الكروموسوم البكتيري للـ E. coli. الكروموسوم البكتيري أي DNA يكون حلقي ويقسم إلى ١٠٠ وحدة. تكبير جزء من DNA عند الوحدة رقم ٨ يوضح مكان lac operon. ويوجد جينات lac Z و lac y و lac A تتحكم في تخليق سكر اللاكتوز. يتم نسخ هذه الثلاث جينات في mRNA واحد.

P أي promoter وهي المنطقة التي فيها إنزيم RNA polymerase يرتبط بجزء DNA أما عن O أي operator وهي المنطقة التي فيها يرتبط repressor بالجزء Lac Z هي عبارة عن جين مسئول عن تكوين الإنزيم الذي يحلل اللاكتوز. ترتيب النيوكليوتيدات في DNA في الجين الخاص بإنزيم اللاكتاز معروف تماماً. أعلى الرسم جزئي تفصيلي لمنطقة O على الكروموسوم البكتيري.

الباب الثالث

تضاعف DNA





## تضاعف DNA

### DNA Replication

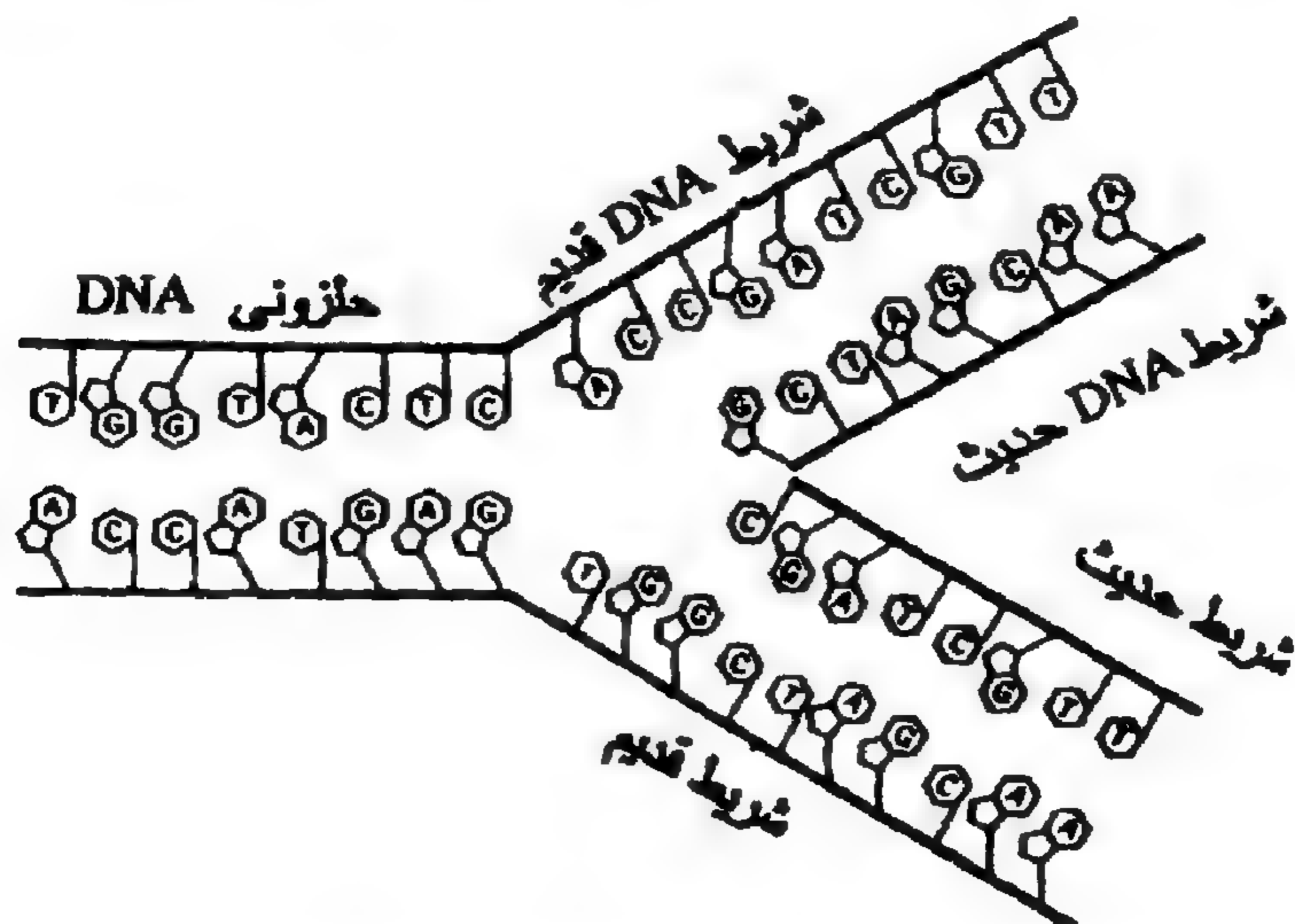
قبل أن تبدأ الخلية في الإنقسام تتضاعف كمية DNA بها حتى تستقبل كل خلية جديدة نسخة طبق الأصل من المعلومات الوراثية الخاصة بالخلية الأم، ويحدث ذلك أثناء الطور البيني interphase في أثناء خطوات إنقسام الخلية، ولقد أشار كل من واطسن وكريك إلى أن تركيب الشريط المزدوج ذي القواعد المتزاوجة لجزيء DNA يحتوى على وسيلة يمكن بها مضاعفة المعلومات الوراثية بدقة. فحيث إن الشريطين يحتويان على قواعد متكاملة، فإن تتابع النيوكليوتيدات في كل شريط يوفر المعلومات اللازمة لإنتاج الشريط المقابل فمثلاً إذا كان تتابع القواعد النيتروجينية في جزء من الشريط هو (5'-A-A-T-C-C-3') فإن قطعة الشريط التي تتكامل معها يكون ترتيب قواعد النيتروجينية (3'-T-T-A-G-G-5') فإذا ما تم فصل شريطي DNA عن بعضهما البعض فإن أي منهما يمكن أن يعمل كقالب لإنتاج شريط يتكامل معه. ولقد قام العلماء بإجراء العديد من التجارب للتأكد من ذلك.

وباستخدام سلسلة من التجارب تمكن كل من ميسلسون Meselson وستال Stahl من إثبات طريقة تضاعف DNA وملخصها أن شريطي DNA ينفصلان عن بعضهما بكسر الروابط الإيدروجينية التي تربط القواعد المتزاوجة ويعمل كل شريط من الشريطين كقالب لبناء شريط جديد ثم يتم تكوين روابط إيدروجينية بين القواعد المتزاوجة للربط بين شريطين أحدهما جديد والآخر قديم. وعند إنقسام الخلية ترث كل خلية جديدة جزيء DNA هجين أي يتكون من شريط قديم وآخر جديد. ولقد أجرى ميسلسون وستال تجاربهما على البكتيريا إلا أنه من الواضح الآن أن DNA في كل الكائنات الحية يتضاعف بنفس الطريقة. ومما هو جدير بالذكر فإن العلماء قد تمكنوا من عمل عملية تضاعف DNA في أنبوبة الاختبار في المعمل وذلك في وجود بعض

المركبات النقية ومنها البروتينات والإنزيمات. ولذلك أمكن فعم ميكانيكية وكيفية حدوث تضاعف DNA بالتفصيل كما سيلي شرحه (شكل ٥٢، ٥٣).

تبدأ العملية بأن يرتبط بروتين بحلزونى DNA وهذا البروتين هو عبارة عن إنزيمات فك حلزونى DNA وتسمى DNA-helicases. تتحرك هذه الإنزيمات على جزيء DNA من أحد الأطراف إلى الطرف الآخر مسببة فك وفصل حلزونى DNA وينفصل الشريطان عن بعضهما ويبتعد كل منهما عن الآخر. يمكن تشبيه ذلك بأن الإنزيم هو إنزيم السوستة وعند شد الإنزيم تنفتح وينفصل شريطى السوستة عن بعضهما unzipping the zipper.

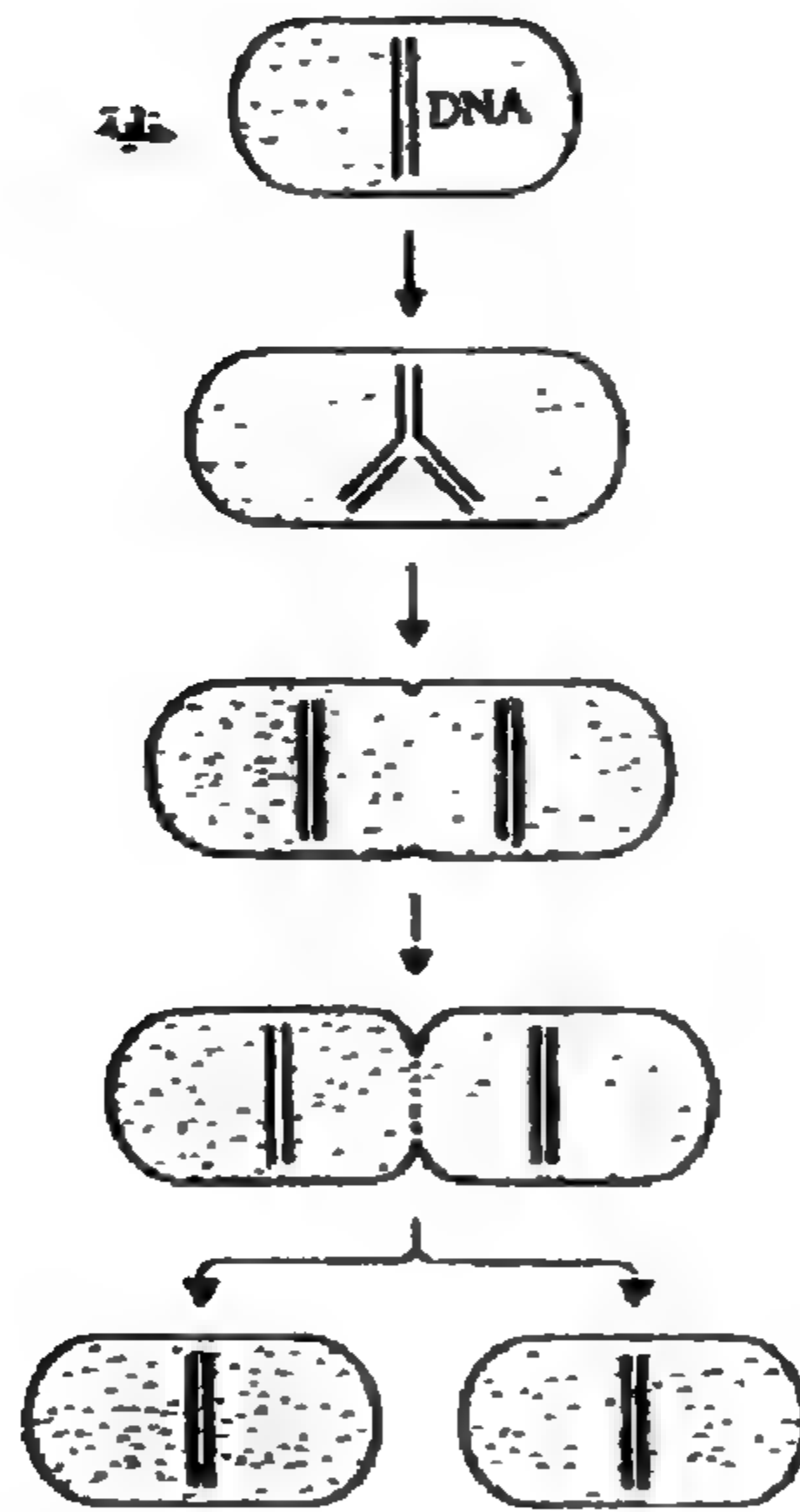
أما البناء الفعلى لحلزونى DNA الجديدان فتقوم بها أحد إنزيمات البلمرة وهى DNA polymerases والتي تساعد على إضافة النيوكليوتيدات واحدة بعد الأخرى وتتميز هذه الإنزيمات بأنها تعمل فى إتجاه واحد فقط unidirectional والتي تساعد على إضافة النيوكليوتيدات واحدة بعد الأخرى إلى النهاية 3' لشريط DNA الجديد.



شكل ٥٢: تضاعف الـ DNA أى تضاعف شريطين أى حلزونى الـ DNA.

ولكى يتم إضافة النيوكليوتيدة إلى الشريط الجديد لابد أن تتزاوج القاعدة النيتروجينية فى النيوكليوتيدة مع القاعدة النيتروجينية الموجودة على شريط القالب

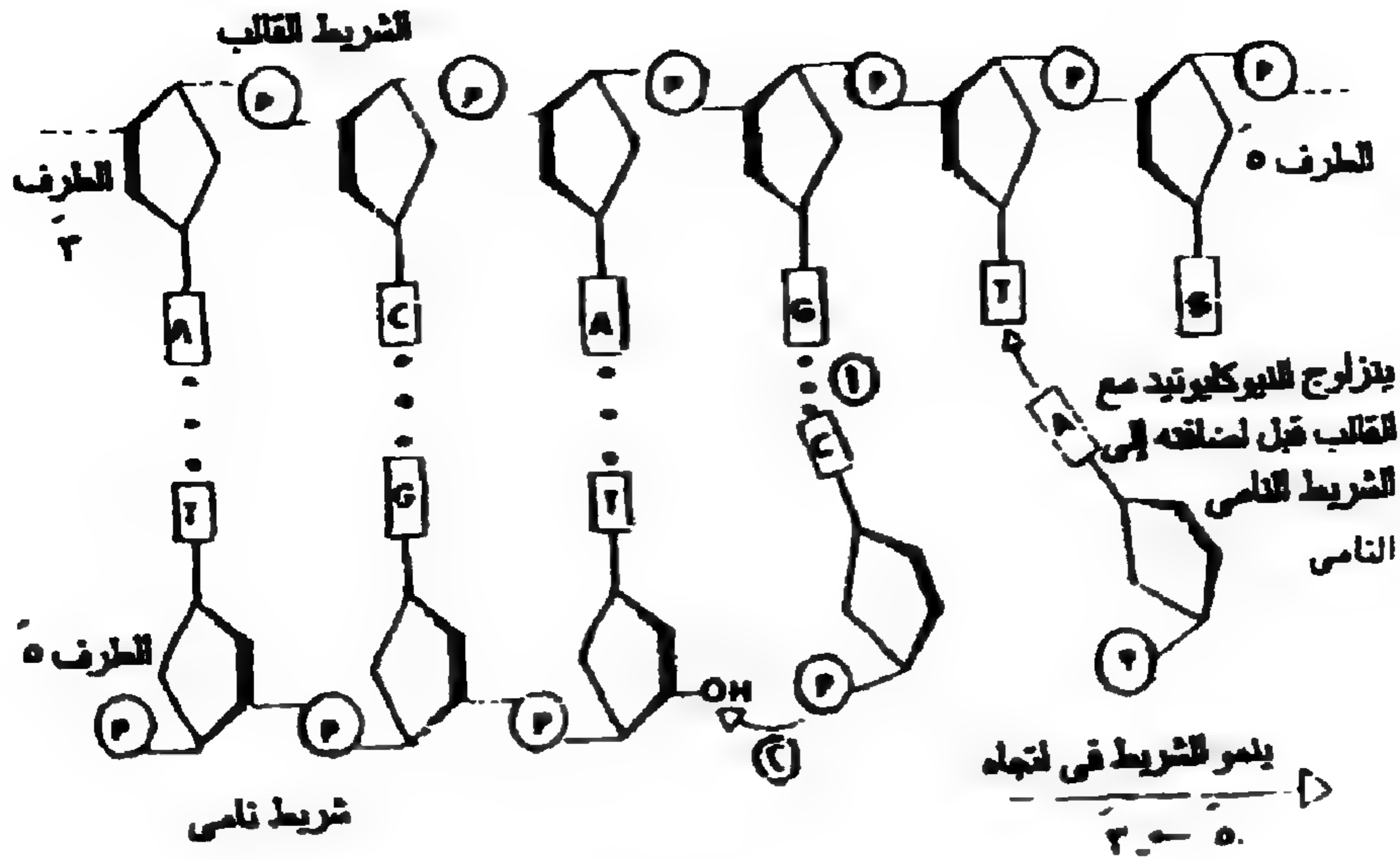
(شكل ٥٤) وهكذا يتكرر ذلك في جميع الحالات وعامة ومن المعروف أن إنزيم البلمرة يعمل في اتجاه واحد فقط من الطرف 5' إلى اتجاه 3' للشريط الجديد الذي يجرى بناؤه. ولقد سبق أن ذكرنا أن شريطي لوب DNA المزدوج متوازيان عكسياً، أي أن أحدهما يكون في اتجاه 5' إلى 3' بينما الشريط المتزاوج معه يتوجه في الاتجاه المعاكس أي في اتجاه 3' إلى 5'. وعلى ذلك فعندما يعمل إنزيم فك الحلزون على فصل شريطي جزيء DNA يتم ذلك في اتجاه النهاية 3' لأحد الشريطين والنهاية 5' للشريط الآخر. وبالنسبة للشريط القالب 3'-5' ليست هناك مشكلة حيث أن إنزيم البلمرة يتبع إنزيم فك الحلزون مباشرة مضيفاً نيوكليوتيدات جديدة إلى الطرف 3'.



شكل ٥٣: خطوات إنقسام خلية إلى خليتين وتضاعف جزيء DNA.

إلا أن ذلك لا يحدث بالنسبة للشريط الآخر المعاكس، وذلك لأن إنزيم البلمرة لا يعمل في اتجاه 3'-5'. هذا الشريط يتم بناؤه على شكل قطع صغيرة في اتجاه 5'-3' بواسطة إنزيم بلمرة آخر polymerase B (شكل ٥٥) ثم ترتبط هذه القطع الصغيرة مع بعضها البعض بواسطة إنزيم الربط DNA-ligase.



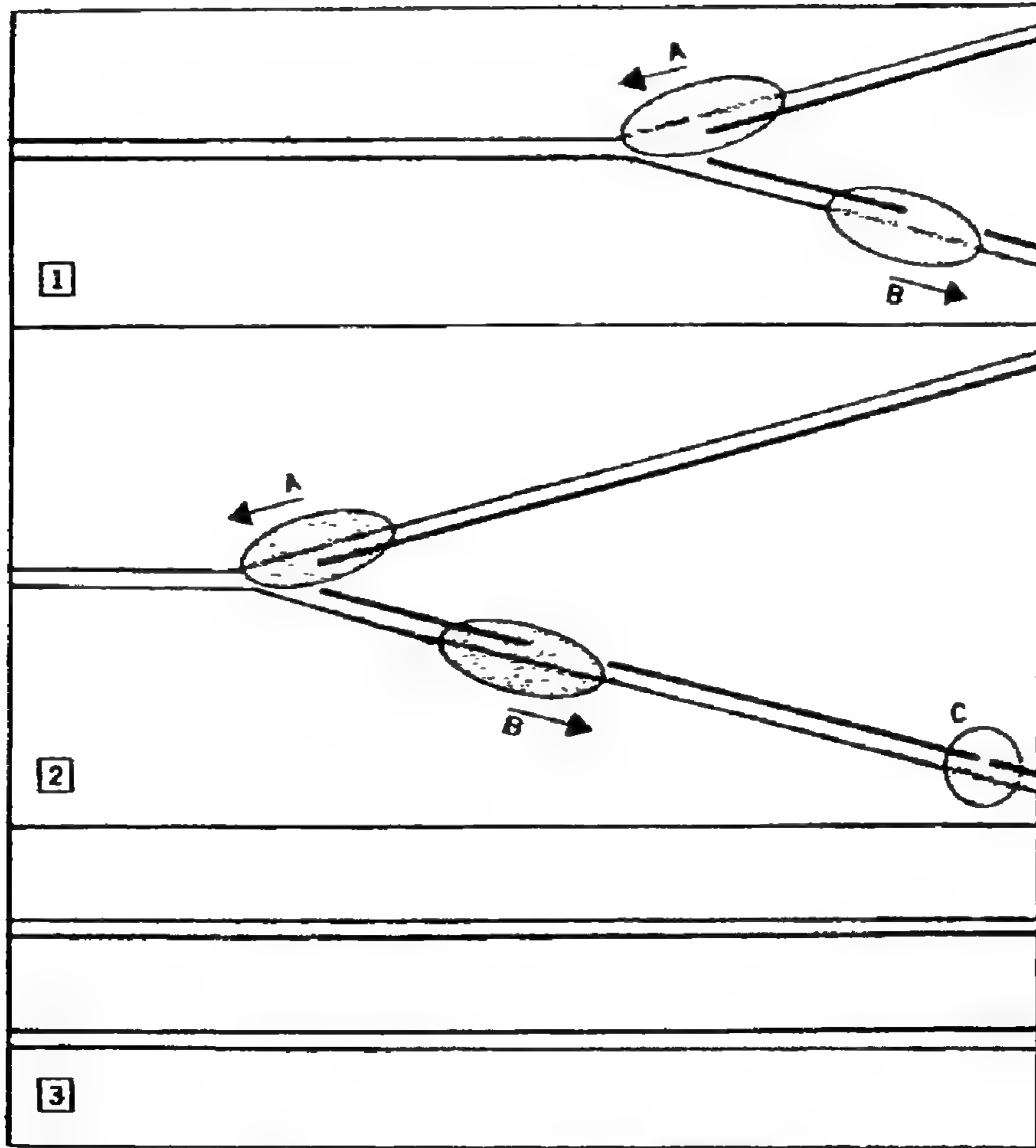


شكل ٥٤: الطريقة التي يعمل بها إنزيم DNA-Polymerase في مضاعفة أحد أشرطة DNA. (١) تتراوح القواعد النيتروجينية مع المتكامل معها على الشريط القالب، (٢) يقوم DNA-polymerase بربط النيوكليوتيدات المتزاوجة في الشريط النامي.

أما عن طريق إنقسام الكروموسوم البكتيري في البكتيريا *E. coli* فقد تمكن كيرنس Cairns عام ١٩٦٣ من وضع أسس إنقسام هذا الكروموسوم. حيث أن تضاعف الكروموسوم يبدأ عند منطقة معينة في محيط الكروموسوم ثم يحدث فك لحلزونى الكروموسوم تدريجياً ويحدث في نفس الوقت تضاعف لكل شريط وهكذا تحدث عملية الفك والتضاعف تدريجياً حتى يتم تضاعف الكروموسوم تماماً. وملخص هذه العملية أنه يحدث كسر في أحد حلزونى DNA عند منطقة معينة تسمى منطقة البداية initiation site ثم يحدث فك لحلزونى DNA تدريجياً وفي نفس الوقت يتضاعف DNA.

أثناء نمو المستعمرة البكتيرية أى أثناء إنقسام الخلايا تتفصل شبه النواة المنقسمة أى المادة النووية عن بعضها أى تبتعد عن بعضها. ويلاحظ عدم وجود أى جهاز فى الخلية البكتيرية مسئول عن ذلك وذلك بالمقارنة بخلايا النبات أو الحيوان العادية eukaryotes. حيث أن انفصال الكروموسوم فى خلايا النبات والإنسان والحيوان العادية أثناء الإنقسام يحدث نتيجة لإتصال سنترومير الكروموسوم ببعض خيوط المغزل وهى عبارة عن أنابيب صغيرة دقيقة microtubules ثم تنكمش هذه

الخيوط أو الأنابيب في اتجاه أحد قطبي الخية وبذلك تبتعد الكروموسومات عن بعضها متحركة في اتجاه قطبي الخلية أثناء الطور الانفصالي. هذه الخيوط وهذه الأنابيب غير موجودة في الخلية البكتيرية فكيف يحدث الانفصال بين الكروموسومات في الخلية البكتيرية؟ وللإجابة على هذا السؤال وضع يعقوب وبرينر وكوزين Jacob و Brenner و Cuzin عام ١٩٦٣ نظرية التضاعف replicon hypothesis للكروموسوم البكتيري وقد سبق شرح ذلك في باب الأحماض النووية.



شكل ٥٥: إنزيم DNA Polymerase منه النوع A الذي يخلق شريط متكامل من DNA في اتجاه فرع الشوكة ولكن النوع B من هذا الإنزيم لا يخلق شريط متكامل من DNA بل يخلق أجزاء متقطعة من شريط DNA في الاتجاه العكسي على الشريط الآخر من DNA ثم تربط هذه الأجزاء بواسطة إنزيم الربط أي الالتحام ligase ويرمز له بالرمز C وفي النهاية يتكون شريطين جديدين متكاملين من DNA.

يعتبر DNA جزيء يكرر نفسه ذاتياً self-replicating ويوجد في صورة جزيء طويل يحتوى ملايين من أزواج النيوكليوتيدات في الكروموسوم وقد يوجد في صورة أصغر حيث يحتوى على آلاف أو مئات الآلاف من أزواج النيوكليوتيدات في البلازميدات. يمكن أن تنتقل بعض البلازميدات في داخل الخلية وتلتحم بالكروموسوم وتصبح جزء منه وذلك في نفس الخلية ونفس العائل ويمكن أن يكون أكثر من ذلك أنها يمكن أن تلتحم بكروموسومات أى صبغيات عائل آخر. تحتوى الفيروسات على DNA أو RNA ويمكن أن تعبر عن expression تركيبها بواسطة mRNA خاص بكل جين. إكتشف هاملتون Hamilton عام ١٩٧٠ أو إنزيم محدد لجزيء restriction endonuclease DNA وهو إنزيم يقوم بقطع جزيء DNA في أماكن معينة بعد تتابع نيوكليوتيدات معينة. تمكن كل من بوير وكوهين Boyer و Chohen عام ١٩٧٣ من إدخال جينات غريبة إلى البلازميد ثم إدخال البلازميد في خلايا البكتيريا وهذه الخلايا الأخيرة بدورها تتكاثر ونتيجة لذلك يتكاثر أيضاً الجين الغريب الذى يحمله البلازميد وهذه الخطوات المختلفة تسمى gene cloning. أمكن إدخال جين من الثدييات في DNA الفاج وذلك لأول مرة عام ١٩٧٥. وفي نفس العام أمكن الحصول على خلية هجين a hybrid cell بين خلية طحال spleen cell قادرة على تكوين أجسام مضادة antibody-producing spleen cell و خلية ورم سرطاني tumor cell تلقائياً بدرجة ملحوظة monoclonal باستمرار. وأمكن التعرف على تتابع أزواج النيوكليوتيدات في جزيء DNA هذه الخلية الهجين بواسطة إنزيمات القطع المحدد restriction enzymes. تمكن Sanger ومساعدوه عام ١٩٧٧ من معرفة وتتابع ٥٣٨٦ زوج من النيوكليوتيدات في DNA الفاج المعروف بإسم  $\phi$ X 174 وفي نفس العام أيضاً إكتشف أن جزيء DNA في النواة توجد فيه أجزاء عبارة عن جينات وأجزاء أخرى ليست جينات ولذلك فإن الجينات المختلفة لا تكون مستمرة على جزيء DNA بل تنفصل إلى أجزاء نتيجة لوجود أجزاء DNA غير جينية non gene DNA. وفي نفس السنة أيضاً إكتشف لأول مرة تتابع كامل للنيوكليوتيدات لأحد جينات الثدييات وهو جين خاص بالجلوبين globin. ولأول مرة في عام ١٩٧٩ أمكن



إدخال DNA غريب في DNA خلية كائن حقيقي النواة وهي خلية فطر الخميرة. ولأول مرة في عام ١٩٨٠ أمكن إدخال جينات غريبة في نواة خلايا الثدييات وذلك في الفيران وأيضاً أظهرت هذه الجينات خواصها expressed في خلايا الفيران.

يعتبر ما سبق إضافات في علم الهندسة الوراثية ويوجد أيضاً إضافات في علم مزارع الأنسجة وفيما يلي موجز لذلك. يعتبر عام ١٩٣٤ هو بداية علم مزارع الأنسجة عندما تمكن هوايت White من فصل القمة النامية لجذور الطماطم وتنميتها على بيئة سائلة ونتاج عن ذلك جذور عادية. تمكن هوايت وآخرون عام ١٩٣٩ من الحصول على مزارع صناعية لنسيج الكاس من نخاع ساق الدخان وأيضاً من جذور الجزر. تمكن بول Ball عام ١٩٤٦ من قطع القمة النامية للساق وزراعتها على بيئة صناعية وأنتج منها نبات كامل. أمكن إثبات عام ١٩٥١ أن قطع القمة النامية للساق بطول ١٠٠ إلى ٢٥٠ ميكرون وتحمل بدائيات ورقتين خضريتين فقط يمكن أن يتكون منها نبات كامل. تمكن موير Muir عام ١٩٥٣ من فصل خلايا مفردة من نسيج الكالس وأمكن تنمية هذه الخلايا المنفردة. أثبت ستيورات Stewart عام ١٩٥٨ أن معلق خلايا الجزر carrot suspension cultures يمكن أن يزرع على بيئات صناعية وينتج منه أشباه أجنة embryoid أي أنه لأول مرة يمكن إنتاج أجنة من خلايا خضرية غير تناسلية وهذا ما أمكن عمله حديثاً في الحيوانات الثديية وأنتج النعجة بوللي وغيرها وبالطبع تصلح هذه التجارب لتطبيقها على الإنسان. وتمكن كوكنج Cocking عام ١٩٦٠ من الحصول على بروتوبلاست خلايا النبات وذلك نتيجة لمعاملة جدر الخلايا بإتريزيمات هاضمة أي محلة لجدر الخلايا. تمكن تاكيبا Takeba ومساعدوه عام ١٩٧١ من إنتاج نبات كامل من بروتوبلاست خلايا النسيج الوسطى أي الميزوفيل لنبات التبغ. تمكن جوها Guha عام ١٩٦٦ من الحصول على نبات أحادي haploid من حبوب اللقاح.

وفي مجال التطبيق للهندسة الوراثية ومزارع الأنسجة بالنسبة للنبات تستعمل البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجي في كثير من

النباتات. يعتبر كلا من هوايت وبراون White, Braun عام ١٩٤٢ أول من تمكنا من الحصول على ورم لهذه البكتيريا خال من البكتيريا قادر على النمو ذاتياً autonomously growing استخدمت أيضاً مزارع الأنسجة للقمة النامية للساق للحصول على نباتات خالية من الإصابة بالفيروس. استخدمت مزارع البروتوبلاست في دراسة عملية الإصابة بالفيروسات وأيضاً دراسة تكاثر الفيروسات ودراسة تأثير سموم الطفيليات النباتية على النبات. استخدم التزاوج بين البروتوبلاست للحصول على هجين مقاوم للأمراض. استخدمت الهندسة الوراثية في التعرف على طبيعة مسبب تكوين الأورام nature of the tumor-inducing principal في حالة بكتيريا التدرن التاجي كما استخدمت الهندسة الوراثية أيضاً في التعرف على التركيب الوراثي للبكتيريا والفيروس.

يعتبر استخدام البكتيريا *Agrobacterium* وبعض الفيروسات النباتية كمستقبل وحامل وناقل لجينات غريبة ثم نقل هذه الجينات الغريبة إلى النبات سيفتح مجال كبير في عمل تحويل في التركيب الوراثي للنبات genetic transformations of plants وبذلك يتم عمل ثورة في التركيب الوراثي للنبات غير معروف مداه ودرجة الاستفادة منه في الوقت الحاضر. كما يمكن أن تستخدم البكتيريا الأخرى والفيروسات لنقل جينات إلى الحيوان أو العكس نقل جينات من الإنسان والحيوان إلى البكتيريا وقد أحدث ذلك بالفعل ثورة علمية منها إنتاج الإنسولين البشري بواسطة البكتيريا.

### **ملحوظة:**

سيتم شرح تضاعق دنا بالتفصيل في كتاب آخر إن شاء الله.

**الباب الرابع**

**الشجرة الوراثية**





## الشفرة الوراثية

### The Genetic Code

من المعروف أنه توجد أحماض أمينية كثيرة ولكن يوجد منها أحماض أمينية أساسية essential amino acids وهى الأحماض التى تدخل فى تركيب البروتينات وأما الأحماض الأمينية الأخرى الغير أساسية فإنها لا تدخل فى تركيب البروتينات. ومن المعروف أنه يوجد عشرون حامض أمينى أساسى وسيتناول شرح الشفرة الوراثية فى هذه الأحماض الأمينية الأساسية دون غيرها.

من المعروف أن هناك عشرين حامض أمينى مختلفة تدخل فى بناء البروتينات وأن هناك أربع قواعد نيتروجينية - نيوكليوتيدات - فقط تدخل فى بناء كل من DNA و RNA وعلى ذلك ((فباللغة)) الوراثة تحتوى على أربعة ((حروف أبجدية)) وهذه الحروف الأربعة من القواعد النيتروجينية يجب أن تشكل عشرين ((كلمة)) تدل كل منها على حمض أمينى معين، ولا يمكن أن تتكون كل كلمة من حرف واحد لأن ذلك يعنى وجود أربع كلمات فقط على صورة شفرة هى A,G,C,U والبروتينات بذلك تحتوى على أربعة أحماض أمينية فقط وبالمثل فإن الكلمات لا يمكن أن تتكون من حرفين (نيوكليوتيدتين) وذلك لأن القواعد النيتروجينية الأربعة إذا رتبت فى كل الاحتمالات الممكنة لإثنين معاً تعطى  $4^2 = 16$  كلمة شفرة codon مختلفة وهذا مازال غير كاف للعشرين حمضاً أمينياً التى تدخل فى بناء البروتين، أما إذا رتبت الأربعة حروف (قواعد نيتروجينية - نيوكليوتيدات) على شكل ثلاثيات فإنها ستنتج  $4^3 = 64$  كلمة شفرة وهذا أكثر من الحاجة لتكوين كلمة شفرة لكل حامض أمينى، وعلى ذلك فأصغر حجم نظرى لكلمة شفرة DNA هو ثلاث نيوكليوتيدات أى ثلاثة قواعد نيتروجينية، الاختلاف الوحيد بين النيوكليوتيدات فى القواعد النيتروجينية. تم فى عام ١٩٦٥ الوصول إلى الشفرات الخاصة بكل حمض أمينى والتى يطلق عليها

اسم كودونات. وهذه الكودونات موجودة في جدول (رقم ٥، ٦) مع ملاحظة أن الكودونات في هذا الجدول هي الكودونات التي توجد في mRNA، أما ثلاثيات شفرة DNA فهي النيوكليوتيدات التي تتكامل قواعدها مع تلك الموجودة في الجدول. كما يتضح من الجدول أن هناك أكثر من شفرة لكل حمض أميني، كما أن هناك كودونا لبدء البروتين وهو AUG وثلاثة كودونات (UGA, UAA, UAG) توقف بناء البروتين أي أنها تعطى إشارة عند النقطة التي يجب أن تقف عندها آلية بناء البروتين وتنتهي سلسلة عديد الببتيد. ذكر أن GUG كودون لبدء البروتين أيضاً (Maloy, Cronan, Freiflder عام ١٩٩٤).

والشفرة الوراثية عامة universal - بمعنى أن نفس الكودونات تمثل شفرات لنفس الأحماض الأمينية في كل الكائنات الحية مثل الفيروسات والميكوبلازما والبكتيريا والنباتات والحيوانات والإنسان والفطريات التي تمت دراستها حتى الآن وهذا دليل قوى على أن كل الكائنات الحية الموجودة الآن على وجه الأرض تعتبر continuum قد نشأت عن أسلاف مشتركة، ولقد كان للمجموعات الرئيسية من الكائنات الحية تاريخ تطوري منفصل لمئات الملايين من السنين، وعلى ذلك يظهر أن الشفرة قد تكونت بعد فترة قصيرة من بدء الحياة واستمرت بدون تغير تقريباً لبلايين السنين منذ ذلك الوقت ونتيجة لذلك حدث التطور في المملكة الحيوانية حتى الأكثر رقياً وهو الإنسان وحدث التطور في المملكة النباتية حتى الأكثر رقياً وهي النباتات الزهرية وأكثر النباتات الزهرية تطوراً هي نباتات العائلة (الفصيلة) المركبة. وأيضاً في المملكة الحيوانية من الحيوانات الأولية - البروتوزوا - عبر المائيات إلى الحيوانات الثديية ومنها الإنسان. وأيضاً التطور من بدائيات النواة إلى حقيقيات النواة.



جدول ٥: الكودونات كما توجد في mRNA الكودونات داخل المربع للبداية.

First position	Second				Third position
(5' end)	U	C	A	G	(3' end)
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	His	Arg	A
	Leu	Pro	His	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Note: The boxed condons are used for initiation.

جدول ٦: الكودونات كما توجد في mRNA.

القاعدة	القاعدة الثانية				القاعدة الثالثة
الأولى	U	C	A	G	
U	UUU Phenylalanine	UCU Serine	UAU Tyrosine	UGU Cysteine	U
	UUC Phenylalanine	UCC Serine	UAC Tyrosine	UGC Cysteine	C
	UUA Leucine	UCA Serine	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leucine	UCG Serine	UAG Stop	UGG Tryptophan	G
C	CUU Leucine	CCU Proline	CAU Histidine	CGU Arginine	U
	CUC Leucine	CCC Proline	CAC Histidine	CGC Arginine	C
	CUA Leucine	CCA Proline	CAA Histidine	CGA Arginine	A
	CUG Leucine	CCG Proline	CAG Histidine	CGG Arginine	G
A	AUU Isoleucine	ACU Threonine	AAU Asparagine	AGU Serine	U
	AUC Isoleucine	ACC Threonine	AAC Asparagine	AGC Serine	C
	AUA Isoleucine	ACA Threonine	AAA Lysine	AGC Arginine	A
	AUG(START) Methionine	ACG Threonine	AAG Lysine	AGG Arginine	G
G	GUU Valine	GCU Alanine	GAU Asparagine	GGU Glycine	U
	GUC Valine	GCC Alanine	GAC Asparagine	GGC Glycine	C
	GUA Valine	GCA Alanine	GAA Glutamic acid	GGA Glycine	A
	GUG Valine	GGG Alanine	GAG Glutamic acid	GGG Glycine	G

## تخليق البروتينات Protein Synthesis

تخليق البروتين يحتاج تواجد أحماض أمينية حرة بالخلية ويحتاج أيضاً بعض من الإنزيمات ولا بد أيضاً من تواجد الريبوسومات بالخلية. كما يقوم RNA بدور رئيسي في هذه العملية. يوجد ثلاثة أنواع من RNA تسهم في بناء البروتين وهي:

١ - حمض RNA الرسول Messenger RNA (mRNA) وهو عبارة عن خيط رفيع ويمكن رؤيته بالمجهر الإلكتروني وهو غير ثابت ويتغير وزنه الجزيئي تبعاً لنوع الخلية وتبعاً لنوع البروتين الذي يقوم ببنائه فقد نجده قصير كما في نوع يسمى leader RNA أي RNA القائد وقد يكون طوله عادي في كثير من الأحوال. يتراوح وزنه الجزيئي من خمسون ألف إلى ٥ ملون دالتون. وهو الذي يحمل الشفرة التي تتحدد تتابع الأحماض الأمينية الداخلة في تركيب البروتين.

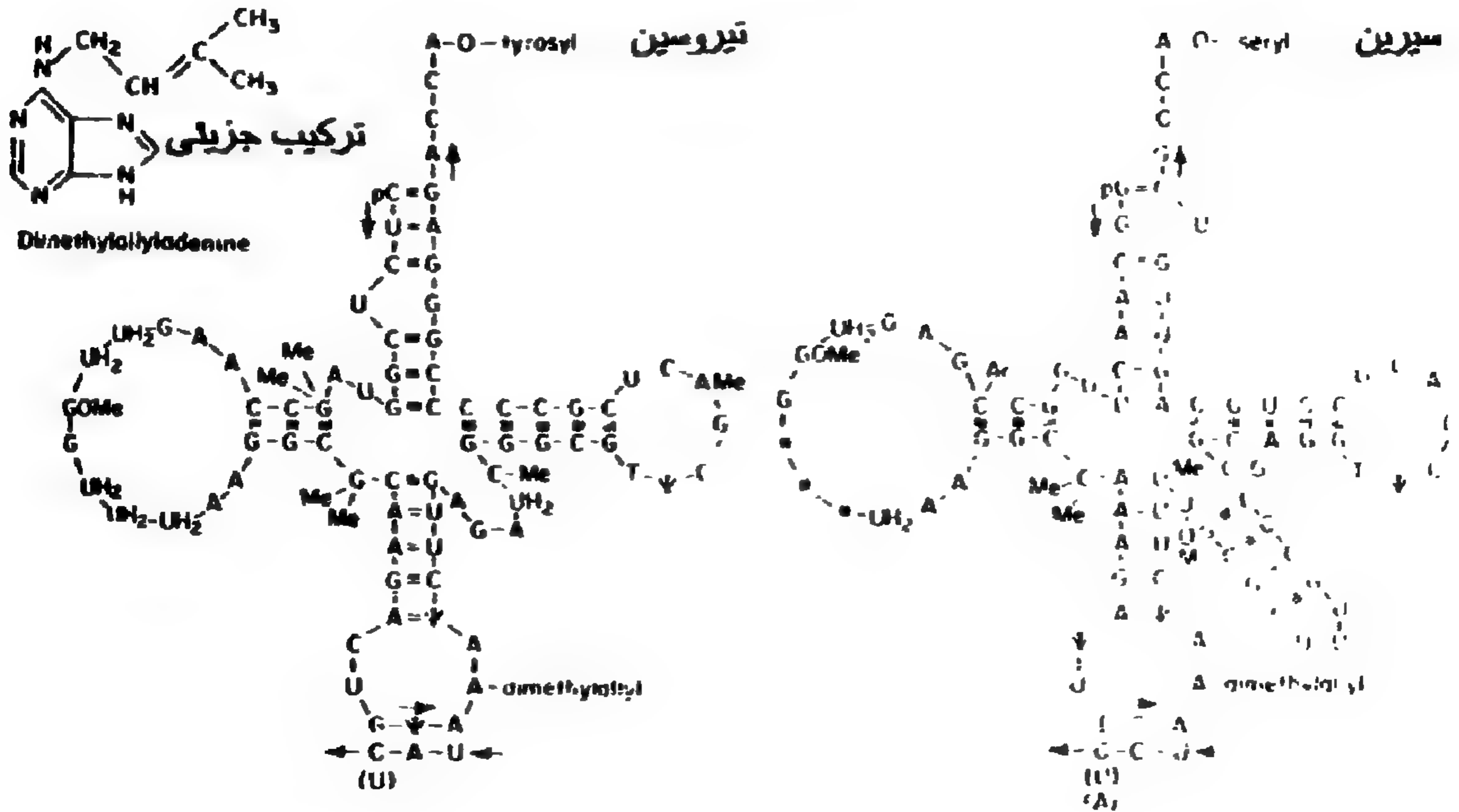
٢ - حمض RNA الريبوسومي rRNA Ribosomal RNA - يدخل في بناء الريبوسومات (أماكن بناء البروتين) عدة أنواع من RNA الريبوسومي وحوالي ٧٠ نوعاً من عديد الببتيد، ويتم بناء الريبوسومات في حقيقيات النواة في منطقة من النواة تسمى النوية، يتم بها بناء الآلاف من الريبوسومات في الساعة، ومما يجعل هذا المعدل السريع ممكناً هو أن DNA في خلايا حقيقيات النواة يحتوي على ما يزيد على ٦٠٠ نسخة من جينات RNA الريبوسومي التي ينسخ منها rRNA، وهناك أربعة أنواع مختلفة من rRNA تدخل مع البروتين في بناء الريبوسومات. وهو مكون رئيسي للريبوسومات وإن كان الدور الذي يلعبه في بناء البروتين مازال غير معروف حتى الآن.

٣ - حمض RNA الناقل tRNA Transfer RNA - تلتف أجزاء من الجزيء لتكون حلقات وبذلك يصبح الجزيء عبارة عن قدم وساق وفروع تنتهي



بحلقات. يختلف عدد الفروع والحلقات باختلاف الجزيء زعادة تكون الفروع إثنان أو ثلاثة وكذلك الحلقات. وهو يتكون من نيوكليوتيدات عديدة وعادة عددها حوالي ثمانون. توجد روابط إيدروجينية تصل أدنين ويوراسيل وبين سيتوسين وجوانين في كل من الساق والفروع أما القاعدة والحلقات فلا يوجد بها قواعد إيدروجينية.

وقد وجد في النباتات الزهرية أن بعض الأحماض الأمينية يحتاج إلى مركب سيتوكينين والبعض الآخر لا يحتاج. فمثلاً في حالة الحامض الأميني سيرين والحامض الأميني تيروسين والحامض الأميني أيزوليوسين تحتاج إلى مركب سيتوكينين وهو مركب (شكل ٥٦) (DMAA) dimethylallyl adenine.



شكل ٥٦: جزيء tRNA ناقل للحامض الأميني سيرين وآخر ناقل للحامض الأميني تيروسين مع وجود مركب (DMAA) dimethylallyl adenine بالقرب من anticodon.

الداي ميثيل الايل أدنين DMAA. وفي حالة tRNA للحامض الأميني أرجينين وفالين وجليسين وفينيل ألانين لا يتكون ولا يحتاج إلى مركب سيتوكينين. أما أهمية المركب السيتوكينيني لـ tRNA فإنه لا بد من وجوده لكي يحدث ارتباط بين مقابل الكودون anticodon في tRNA والجزء المخصص له على كودون mRNA.

وهناك موقعان هاما على جزيء tRNA لهما دخل بناء البروتين، الموقع الأول يوجد في قمة الجزيء هو الذي يتحد فيه الجزيء بالحمض الأميني الخاص به، ويتكون هذا الموقع من الثلاث قواعد CCA أما الموقع الآخر هو السطح السفلي للقاعدة مقابل الكودون anticodon الذي تتزاوج قواعده مع كودونات mRNA المناسبة عند مركب mRNA والريبوسوم حيث يحدث ارتباط مؤقت بين tRNA و mRNA يسمح للحمض الأميني المحمول على tRNA أن يدخل في سلسلة عديد الببتيد في المكان المحدد. ولهذا النوع دور هام ورئيسي في بناء البروتين حيث أنه يقوم بحمل الأحماض الأمينية إلى الريبوسومات، ولكل حمض أميني نوع خاص من RNA يتعرف على الحمض الأميني وينقله (الأحماض الأمينية التي لها أكثر من شفرة يكون لها أكثر من tRNA)، وينسخ tRNA من جينات tRNA التي توجد عادة على شكل تجمعات من ٧-٨ جينات على نفس الجزء من جزيء DNA.

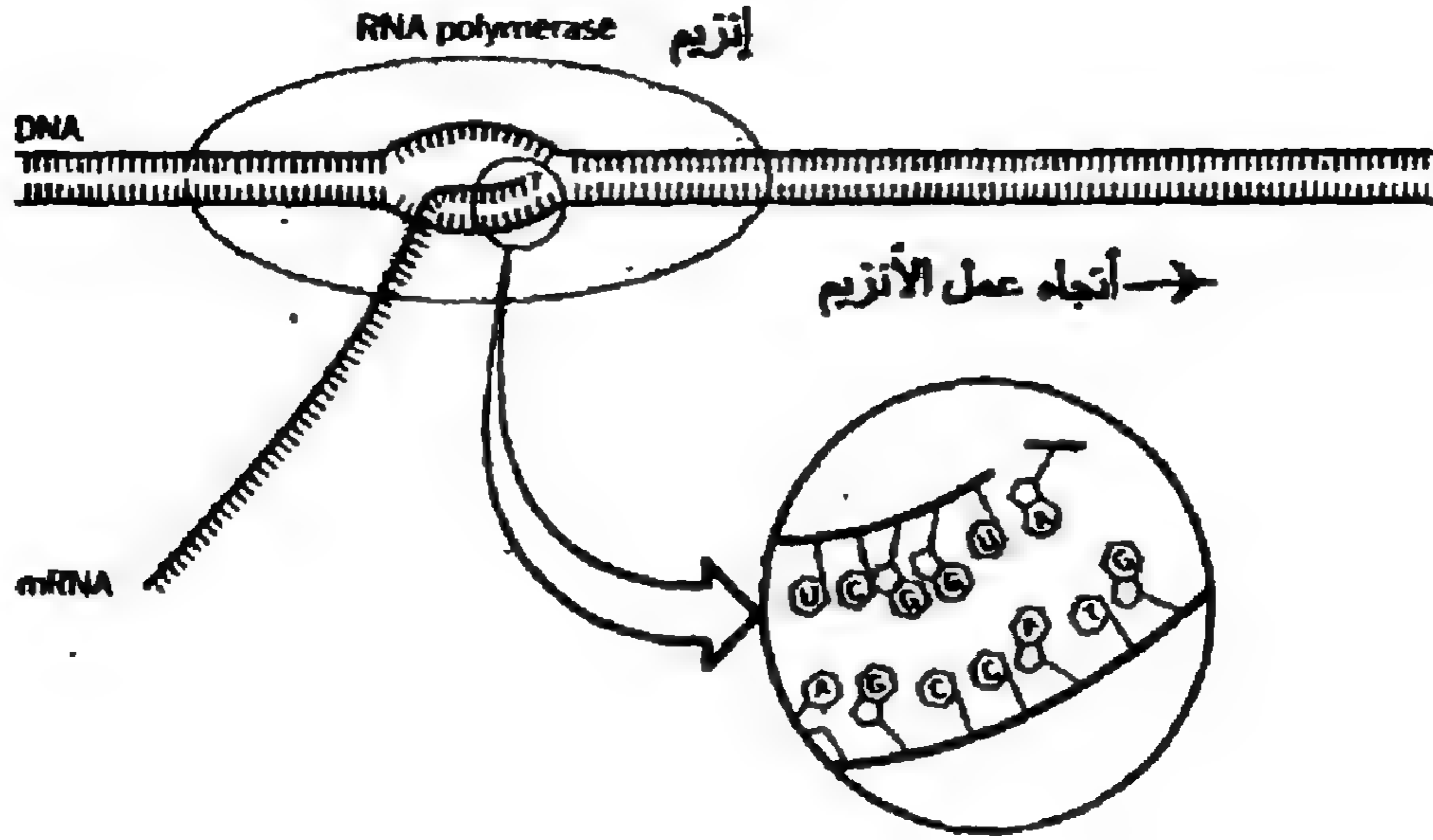
### خطوات تخليق البروتين:

تحدث خطوات عديدة متعاقبة في بناء البروتين وهي ما يأتي:

#### ١ - النسخ Transcription:

وهي عبارة عن عملية نسخ DNA إلى RNA أي أن يصبح RNA متوازن ومتكامل في تركيبه مع شريط DNA الناتج منه. ويحدث ذلك بواسطة إنزيم آخر من إنزيمات البلمرة وهو RNA-polymerase. ويبدأ هذا الإنزيم في العمل على جزيء DNA ويسبب فك وإبتعاد شريطي DNA عن بعضهما في مسافة قصيرة وهي تتراوح بين عشرة إلى عشرون تيكليوتيد ثم يقوم بوضع النيوكليوتيدات المكملة لشريط DNA في هذه المنطقة ويتم ربطها وهكذا يتحرك الإنزيم عبر جزيء DNA ليكون سلسلة من النيوكليوتيدات والتي يتكون منها mRNA يلاحظ أن النيوكليوتيدات التي يتكون منها تكون حرة في الخية، أن الإنزيم يضعها في مكانها المناسب على شريط DNA ويقوم بربطها (شكل ٥٧).

وبذلك يتكون mRNA مكمل في تركيبه لشريط DNA ومشابه له يختلف عن DNA في إحتوائه على قاعدة يوراسيل بدلاً من الثيمين وأيضاً في وجود سكر الريبوز بدلاً من سكر دي أكسي ريبوز، يتوقف عمل الإنزيم عندما يصل إلى شفرة stop ولذلك تتحرر سلسلة mRNA ولا ترتبط بشريط DNA وتصبح حرة في الخلية.



شكل ٥٧: فك شريطي DNA عن بعضهما في مكان عمل الإنزيم RNA polymerase وتكوين شريط جديد من mRNA أي عملية النسخ.

## ٢- الترجمة Translation:

يتكون الريبوسوم من تحت وحدتين أحدهما كبيرة والأخرى أصغر، وعندما لا يكون الريبوسوم قائماً بعمله في إنتاج البروتين فإن تحت الوحدتين تنفصلان عن بعضهما وتتحرك كل منهما بحرية، وقد يرتبط كل منهما بتحت وحدة أخرى من النوع المقابل عندما تبدأ عملية بناء البروتين مرة أخرى. توجد الريبوسومات حرة في سيتوبلازم الخلية أو توجد ملتصقة بسطح الشبكة الأندوبلازمية ويكون نتيجة لذلك الشبكة الأندوبلازمية الخشنة. تبدأ عملية الترجمة بإرتباط mRNA بالريبوسوم وغير معروف التفاصيل الدقيقة لعملية الربط. ولكن من المعروف أنه لكل mRNA موقع إرتباط بالريبوسوم وهو عبارة عن تتابع للنوكليوتيدات يرتبط بالريبوسومات وأول



ثلاثة نيوكليوتيدات ترتبط بالريبوسوم تسمى كودون البداية start codon ويمكن شرح ذلك في حالة أوليات النواة حيث يرتبط mRNA بالريبوسوم وبحيث يصبح أول كودون أي كودون البداية متجهاً إلى أعلى أي أن العمود الفقري back bone للجزء يكون لأسفل والقواعد النيتروجينية لأعلى وهو الوضع الصحيح للترجمة. يكون هذا الكودون (شكل ٥٨) هو AUG كما في الجدول إما في الطرف الآخر من mRNA فيوجد ذيل مكون من حوالي مائتين أدنين A يعتقد أن هذا الذيل يحمي mRNA من التحليل بواسطة الإنزيمات الموجودة في السيتوبلازم.

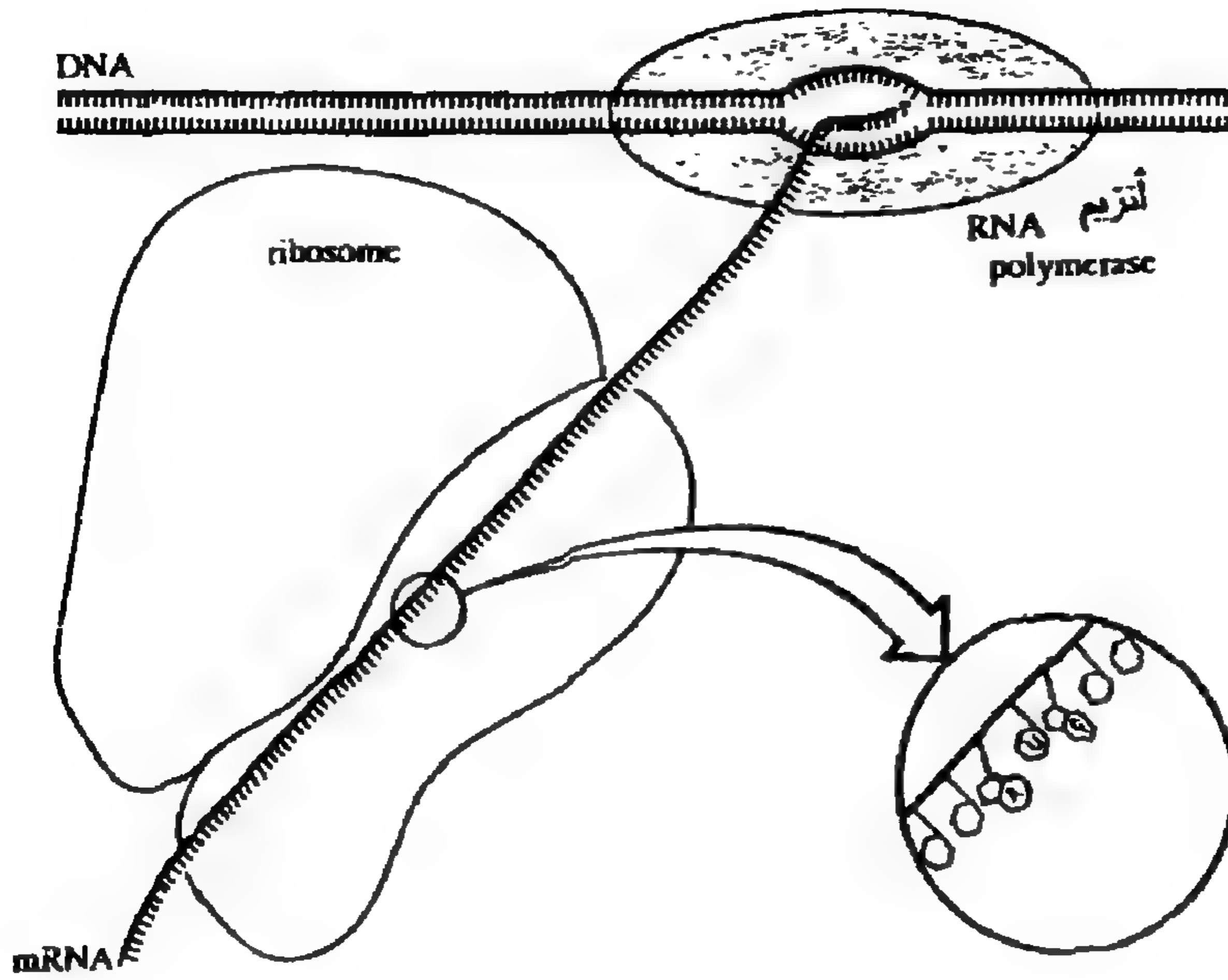


شكل ٥٨: شكل تخطيطي لجزء mRNA يظهر به موقع الارتباط بالريبوسوم. وذيل عديد الأدينين ويتجه أول كودون به إلى أعلى.

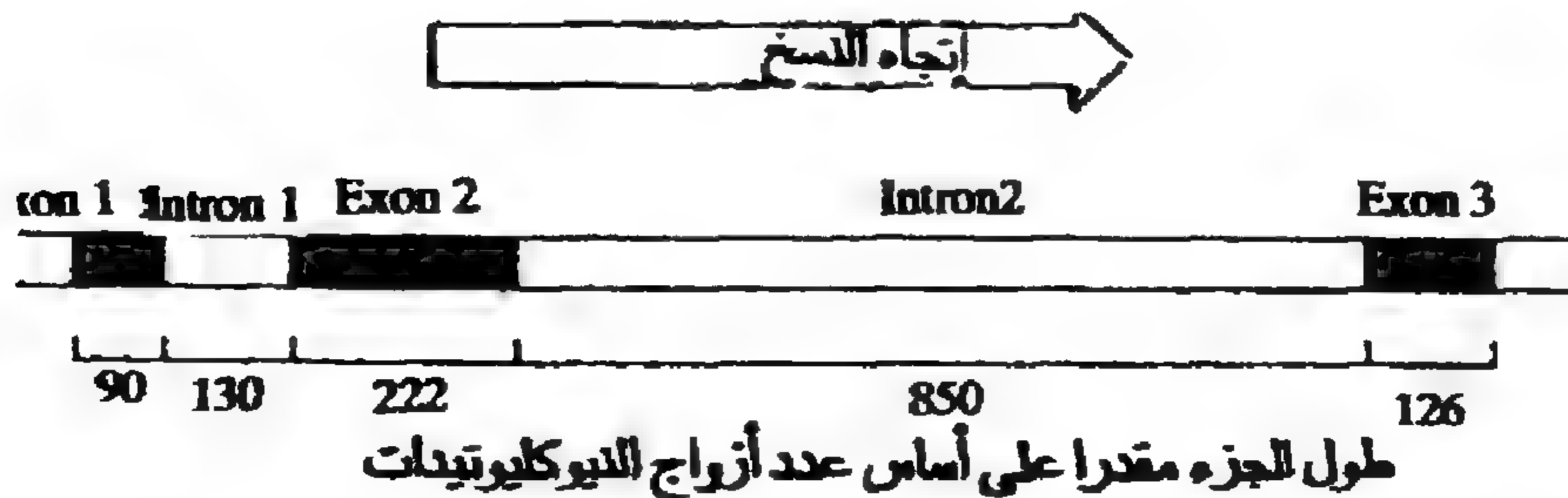
تختلف أوليات النواة عن حقيقيات النواة في هذه الحالة فقد وجد البكتيريا أن الريبوسومات ترتبط ببداية mRNA وتبدأ حدوث الترجمة وتخليق البروتين بينما يكون الطرف الآخر للجزء mRNA مازال في مرحلة البناء على شريط DNA (شكل ٥٩) أما في حقيقيات النواة فإن mRNA ينفصل تماماً عن شريط DNA ويصبح حر قبل ارتباطه بالريبوسوم ويحدث ذلك في الإنسان. ويتداخل mRNA في جميع الحالات مع تحت الوحدة الصغيرة من الريبوسوم وليست مع تحت الوحدة الكبيرة.

تختلف أوليات النواة عن حقيقيات النواة في فرق آخر جوهري وهو أن الجين في حقيقيات النواة يتكون من أجزاء فعالة من النيوكليوتيدات أي أجزاء لها شفرة coding regions وتدخل في بناء البروتين وتسمى إكسونات exons ويفصل بين هذه الأجزاء الفعالة أجزاء غير فعالة من النيوكليوتيدات أي أجزاء ليس لها شفرة noncoding regions ولا تدخل في بناء البروتين وتسمى إنترونات introns ومثال

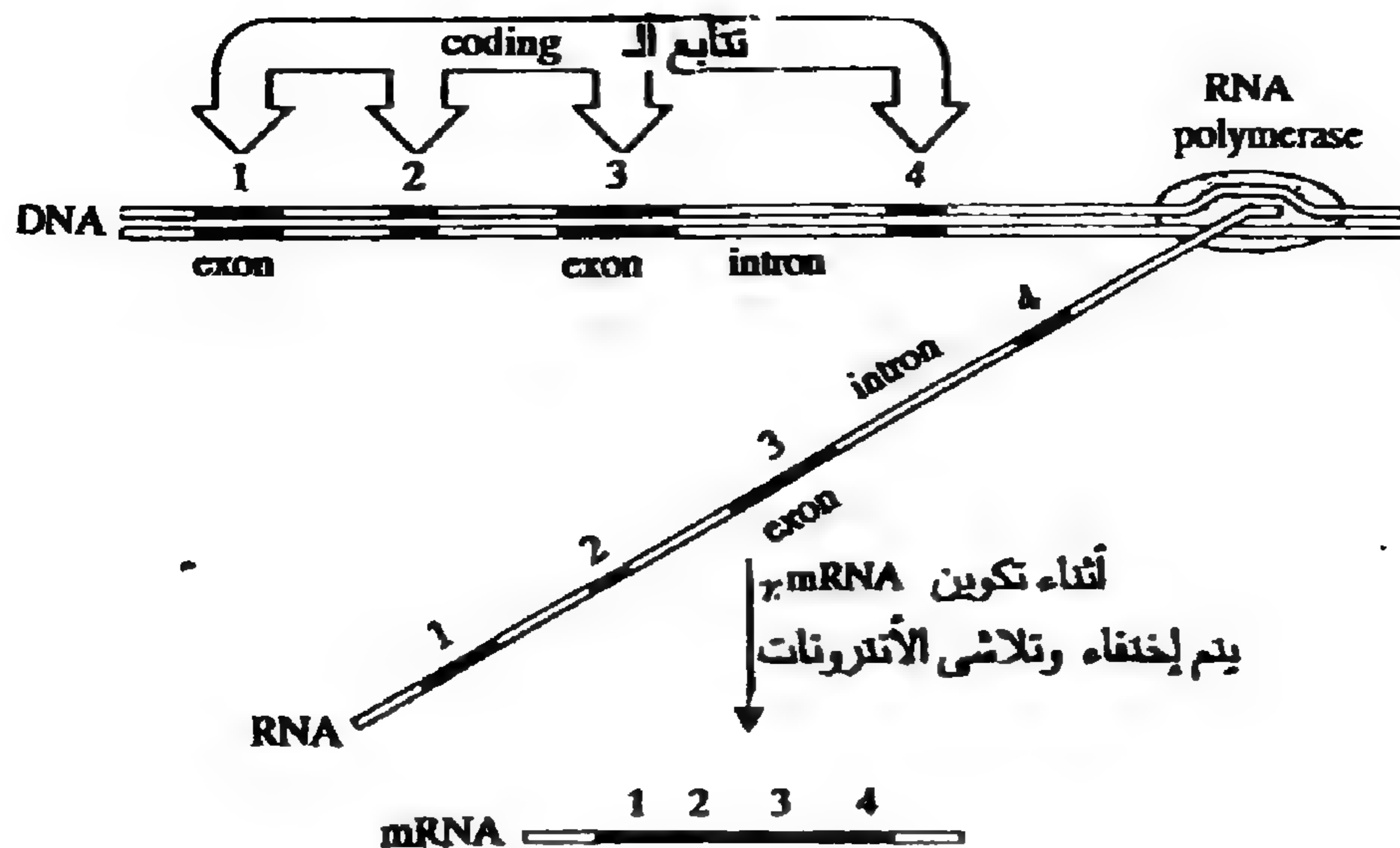
ذلك الجين الموجود في الإنسان والخاص بتكوين بروتين  $\beta$ -globin فإنه يتكون من ثلاث exons وإثنين introns. يعتبر B-globin أحد مكونات هيموجلوبين الدم (شكل ٦٠).



شكل ٥٩: تكوين mRNA من جزيء DNA وإرتباطه بالريبوسوم في كائنات أوليات النواة.



شكل ٦٠: تركيب جين B-globin في الإنسان يتكون من exons و introns وعددهم أزواج النيوكليوتيدات في كل جزء.



شكل ٦١: إختفاء الإنترونات أثناء تكوين mRNA. جزء من جين يوجد به ٤ أكسونات وأيضاً أنترونات. وأثناء تخليق RNA يوجد به أيضاً إكسونات وأنترونات ولكن عند تمام تكوين mRNA تختفي الإنترونات ولا توجد إلا الإكسونات.

تختلف هذه الأجزاء في عدد النيوكليوتيدات ففي إكسون رقم ١ يتكون من تسعون زوج وفي إكسون رقم ٢ يتكون من ٢٢٢ زوج وفي إكسون رقم ٣ يتكون من ١٢٦ زوج وفي إنترون رقم ١ يتكون من ١٣٠ زوج وفي إنترون رقم ٢ يتكون من ٨٥٠ زوج. وفي أنواع أخرى من الجينات قد يكون في الجين الواحد أكثر من خمسون إنترون. ولكن في أوليات النواة الأمر يختلف حيث أن الجين في خلايا البكتيريا لا يحتوى إطلاقاً على إنترونات. ولذلك فإن mRNA في حقيقيات النواة يتكون من مناطق تقابل الإكسونات ومناطق تقابل الإنترونات وذلك في أثناء تكوينه ولكن عندما يكون قابل للإلتحام بالريبوسوم فإنه يصبح خال من الإنترونات ويصبح قصير (شكل ٦١). ويتضح أن الخلية لها نظام معين يمكن عن طريقه قطع الإنترونات وفصلها من mRNA ولذلك يصبح mRNA في النهاية خال منها وعبرة عن أكسونات ملتصقة ببعضها ولذلك يصبح قصير الطول. أما عن كيفية حدوث ذلك في الخلية فهو غير معروف. أما في بدائيات النواة مثل البكتيريا فإن mRNA لا يحتوى على مناطق إنترونات في أثناء تكوينه ولذلك فإن طوله لا يقصر عند إرتباطه بالريبوسوم. يعتقد



أن البكتيريا كانت تكون mRNA به إنترونات ولكن أثناء التطور عبر ملايين السنين فقدت البكتيريا هذه الصفة وأصبح الآن mRNA البكتيري خال من الإنترونات.

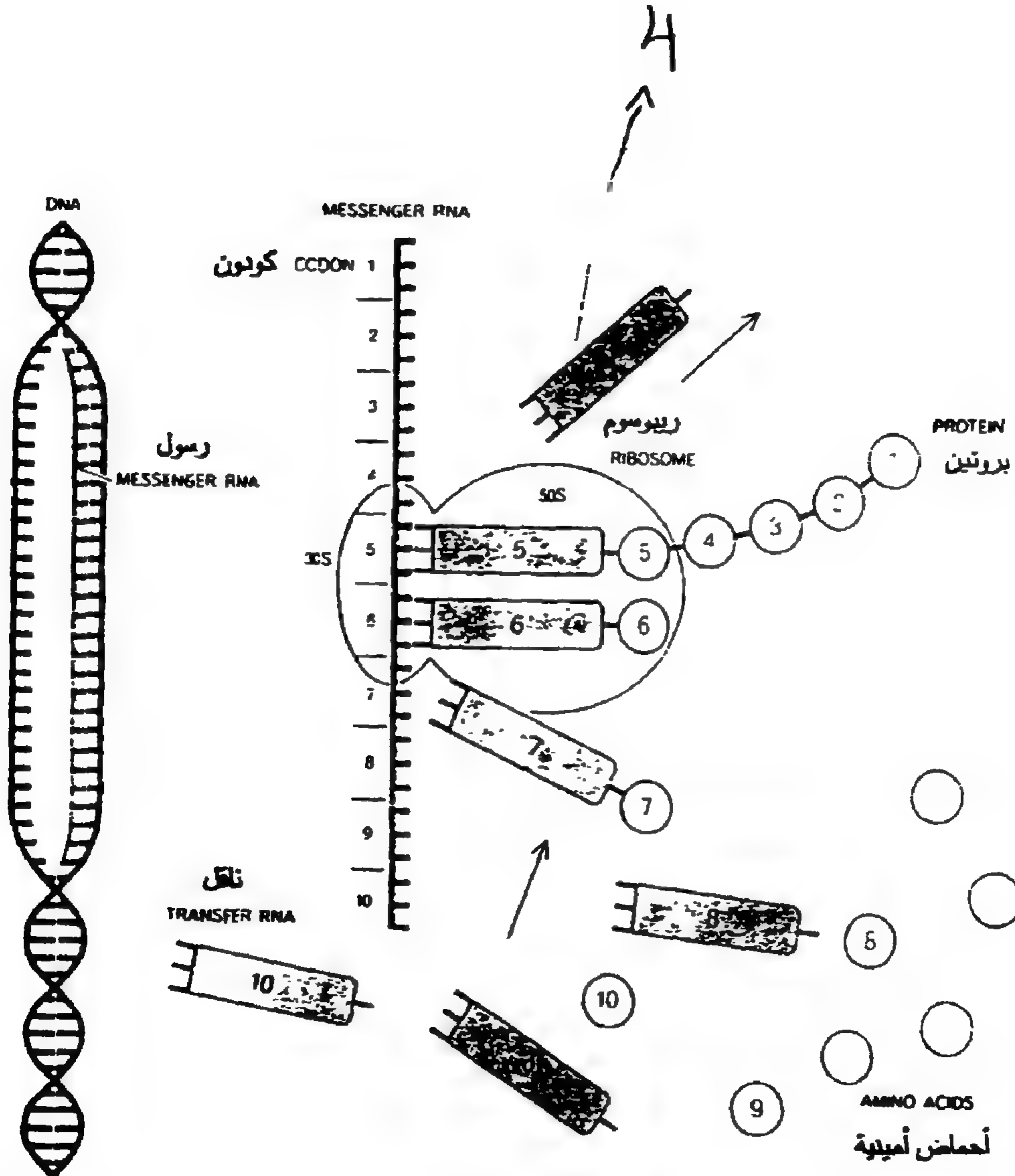
يوجد على الريبوسوم موقعان يمكن أن ترتبط بهما جزيئات tRNA. الموقع p على الريبوسوم يسمى موقع الببتيديل peptidyl والموقع A الى يليه يسمى موقع أمينوأسيل أو أمينوأكيل aminoacyl. ولذلك فإن في البداية يكون كودون البدء AUG عند موقع الببتيديل. لكل حامض أميني tRNA خاص به ويرتبط الحامض الأميني في قمم tRNA الخاص به بواسطة إنزيم aminoacyl tRNA synthetase. وحيث أنه يوجد عشرون حامض أميني فإنه يوجد عشرون tRNA وعلى الأقل عشرون نوع من إنزيم tRNA synthetase حيث أنه على الأقل يوجد إنزيم خاص لكل حامض أميني. وكل إنزيم قادر على التعرف على نوع tRNA الخاص به ويلتصق به ويقوم بربط الحامض الأميني الخاص به بـ tRNA. الأحماض الأمينية المختلفة توجد حرة في الخلية وذلك قبل إرتباطها بـ tRNA. وبعد ربط الحامض الأميني بـ tRNA الخاص به فإن الإنزيم يتحرر ويصبح حر ويكرر عملية الربط مرة أخرى. يتداخل tRNA بما يحمله من حامض أميني مع الريبوسوم وغير معروف حتى الآن كيفية حدوث وطبيعة التداخل. ولكن يوجد عدة تفسيرات لكيفية حدوث العملية ومنها أن tRNA المرتبط بالحامض الأميني يتحرك ويستقر على المنطقة المخصصة له على mRNA المتداخل مع تحت الوحدة الصغرى من الريبوسوم وهي موقع أمينوأسيل في الريبوسوم وبعد ذلك ترتبط تحت الوحدة الكبرى الحرة بتحت الوحدة الصغرى السابقة لتتكون وحدة الريبوسوم الكاملة. ولكي تحدث الخطوات ويتكامل الريبوسوم يحتاج إلى أنواع خاصة من البروتين وتسمى بعوامل البداية (البدء) initiation factors (IF) وهي IF1 و IF2 و IF3. أول كودون في mRNA هو AUG وتكون القواعد النيتروجينية متجهة لأعلى ثم تتزاوج بواسطة الروابط الإيدروجينية قواعد مقابل الكودون UAC لجزء tRNA الخاص بالميثيونين مع كودون AUG وذلك في موقع الببتيديل وبذلك يصبح الحامض الأميني ميثيونين methionine أو حامض أميني في سلسلة عديد الببتيد التي ستبنى. وأما عن عملية ربط ثان الأحماض الأمينية في

سلسلة عديد الببتيد فإن tRNA الثانى يرتبط بحامض أمينى معين يرتبط مقابل الكودون الخاص به بالكودون التالى على جزيء mRNA وبالتالي يصبح الحامض الأمينى الذى يحمل جزيء tRNA الحامض الأمينى الثانى فى السلسلة. يحدث بعد ذلك تفاعل خاص لربطه الحامضين الأمينين ببعضهما بواسطة ببتيدية ويسمى تفاعل نقل الببتيد *peptidyl transferase reaction* والإنزيم الاص بهذا التفاعل عبارة عن جزء من تحت وحدة الريبوسوم الكبيرة. بذلك يرتبط الحامض الأمينى الأول فى السلسلة وهو الميثيونين بالحامض الأمينى الثانى فى السلسلة على tRNA الاثنى ولذلك يصبح tRNA الأول والذى كان يحمل الحامض الأمينى ميثيونين فارغ. وفى هذه الأثناء يصبح tRNA الثانى فى موقع الببتيد ويلقى عليه أيضاً موقع *p,p site* وفى نفسه هذه اللحظة يتحرك mRNA نفس المسافة.

يوجد رأى أن الريبوسوم يتحرك فى عكس إتجاه بداية mRNA وفى كلا الحالتين يصبح الموقع أمينوأسيل ويلقى عليه أيضاً موقع A، *A site* فارغ ومستعد لإستقبال tRNA ثالث يحمل حامض أمينى ثالث ونتيجة لذلك يصبح tRNA الأول والذى كان يحمل الحامض الأمينى ميثيونين فارغ وحر ويترك الريبوسوم وهكذا تتكرر العملية وتزداد سلسلة الأحماض الأمينية فى الطول (الأحماض الأمينية المرتبطة ببعضها على هيئة سلسلة بروابط ببتيدية تسمى عديد الببتيد *polypeptide*) وهكذا تستمر العملية حتى نصل إلى أحد كودونات التوقف *Stop* وهى *UAG* و *UAA* و *UGA* وفى هذه الحالة تتوقف العملية ويحرر عديد الببتيد من الريبوسوم. وتحتاج عملية تحرر عديد الببتيد إلى نوع من البروتين يسمى عامل التحرير حيث يرتبط بروتين عامل التحرير *(RF) release factor* بكودون التوقف فى المكان *(A) amino acyl* على الريبوسوم.

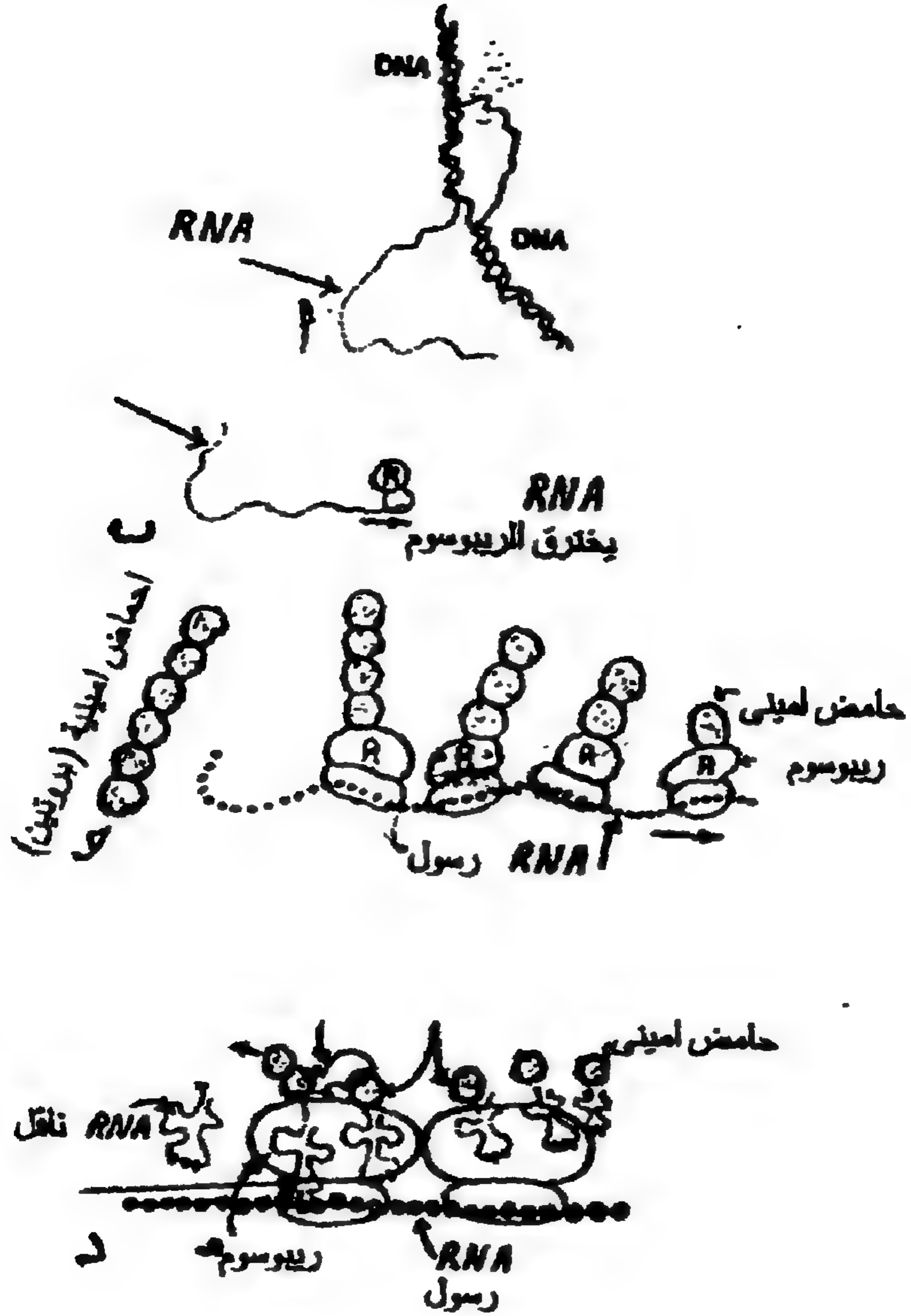
وبعد ذلك ينفصل تحت وحدتين الريبوسوم الصغيرة والكبيرة وعن mRNA وذلك فى وجود نوع خاص من البروتين يسمى عامل البداية *(IF3) initiation factor*. توجد أعداد كبيرة من الريبوسومات متصلة بجزيء واحد من mRNA وتعمل فى آن واحد ويسمى ذلك التركيب بعديد الريبوسومات *polysomes* أو *polyribosomes* حيث أنه عند بروز طرف mRNA من الريبوسوم ترتبط بتحت وحدة ريبوسوم أخرى

صغيرة تبدأ بدورها بناء عديد الببتيد وهكذا تتكرر العملية والإرتباط بالريبوسوم حتى يلتصق عدد كبير من الريبوسومات قد يصل مائة (شكل ٦٢-٦٥). يعتقد أن mRNA يخترق تحت الوحدة الصغرى من الريبوسوم ولكن الآن يفضل الرأي أن mRNA يوجد بين تحت الوحدتين الملتصقتين ببعضهما.

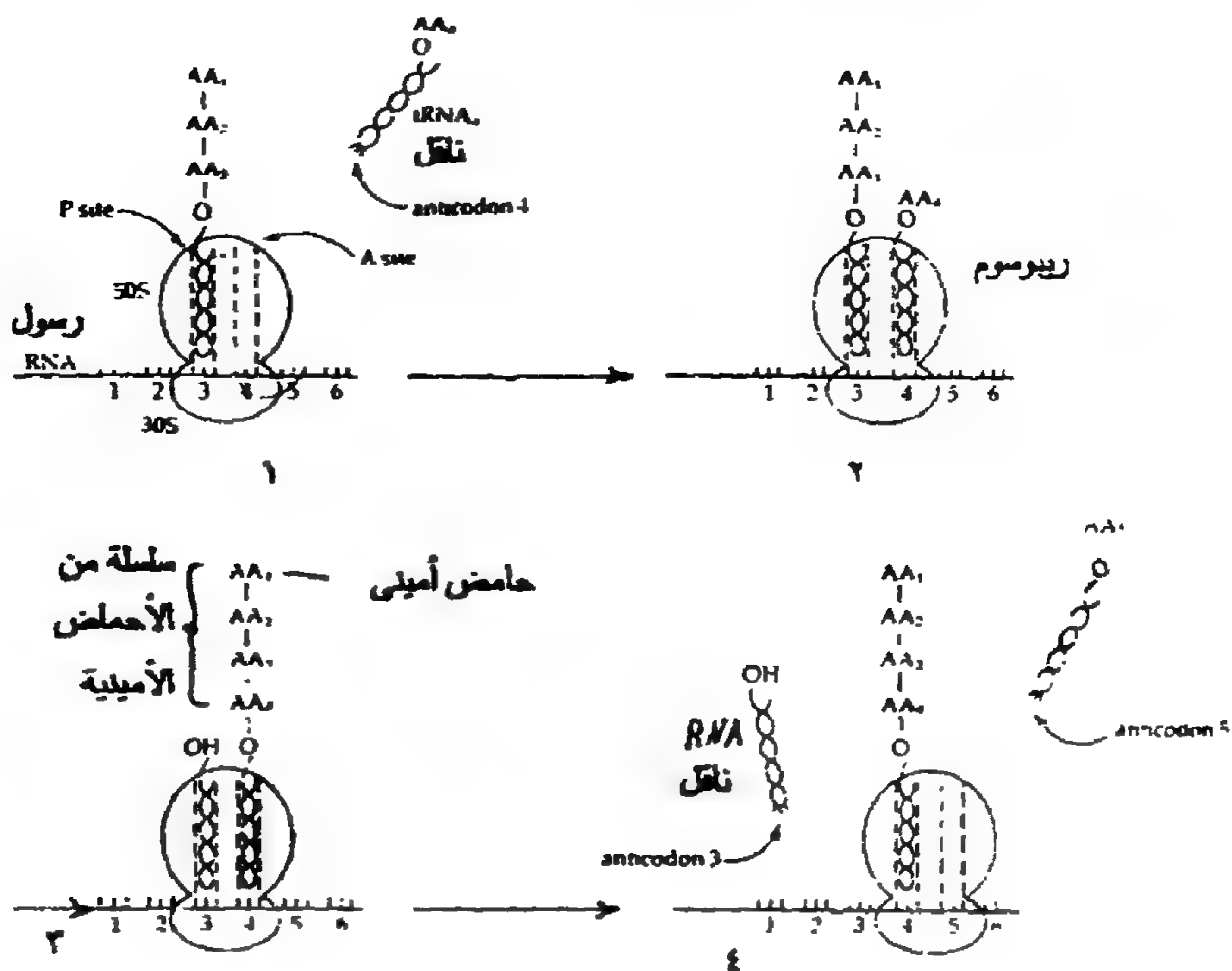


شكل ٦٢: خطوات تخليق البروتين. ويلاحظ أن RNA الناقل مستطيل الشكل للسهولة ولكنه يتكون من ساق وفروع ورأسين أو ثلاثة وقاعدة.

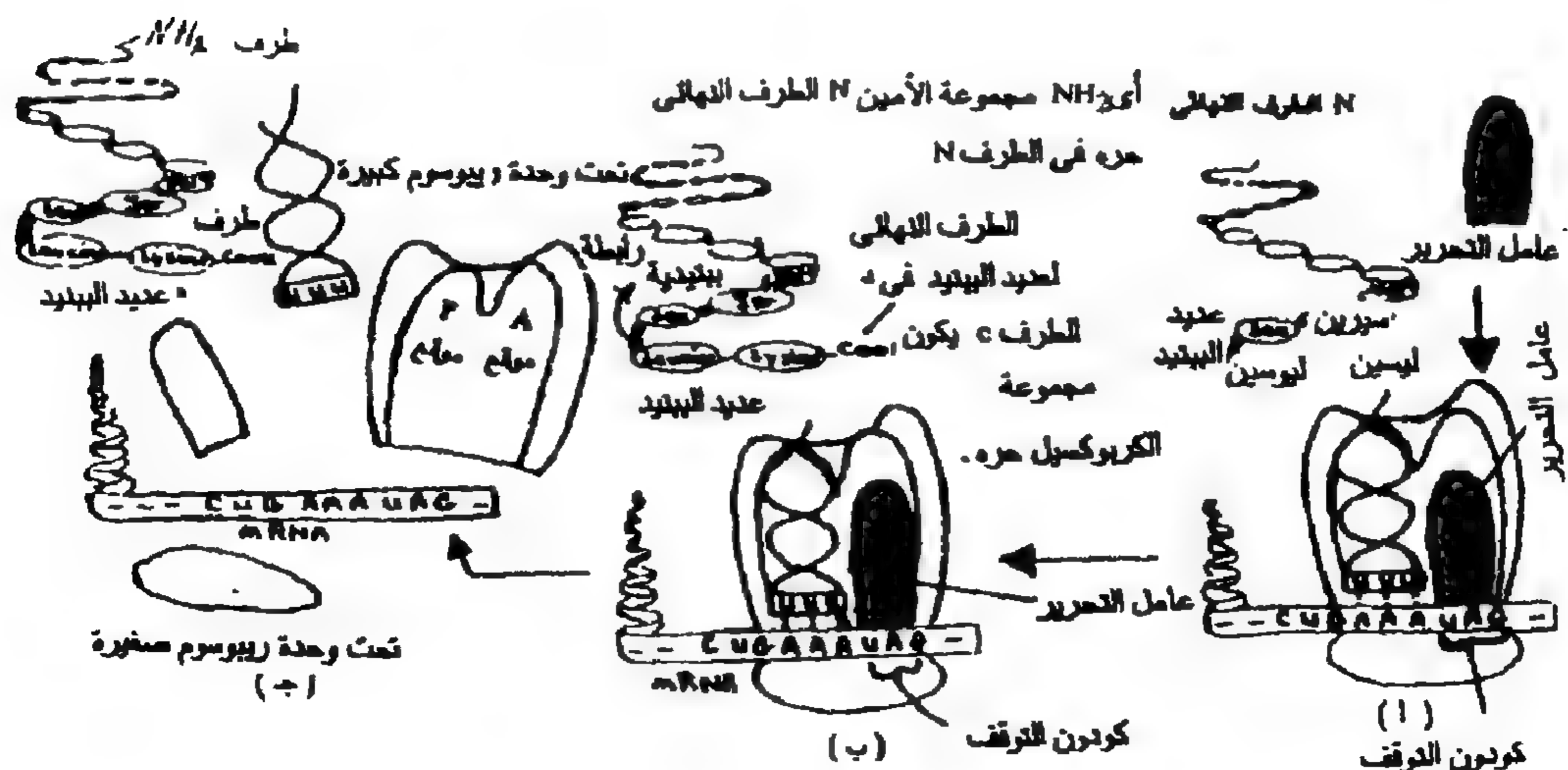




- شكل ٦٣: خطوات تكوين بروتين الخلية.
- (أ) تكوين RNA رسول من DNA.
- (ب) اختراق RNA رسول للريبوسوم.
- (ج) عديد الريبوسومات يكون البروتين.
- (د) منظر تفصيلي لعديد الريبوسومات وتكوين البروتين.



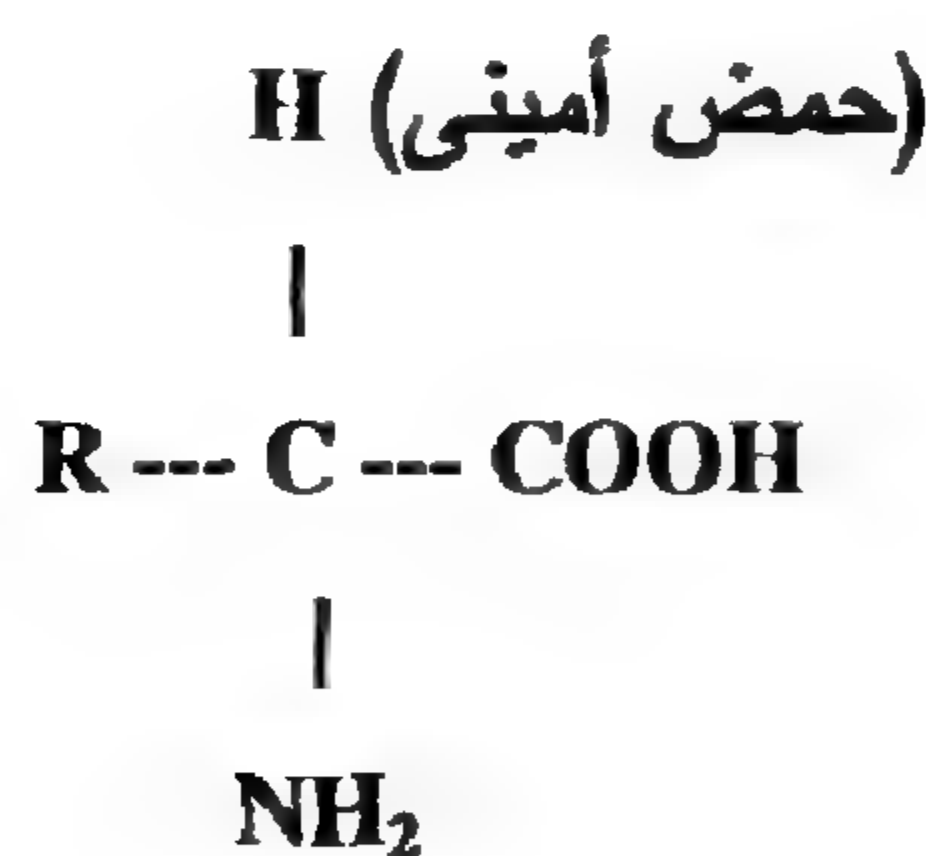
شكل ٦٤: خطوات تخليق البروتين بواسطة mRNA حيوياً



شكل ٦٥: إنهاء تكوين سلسلة عديد الببتيد. (أ) عندما يصل كودون إيقاف عند الموقع ١. يرتبط به عامل التحرير، (ب) ينتهي بناء عديد الببتيد ويتحرر، (ج) تستقل تحت وحدات الريبوسوم عن mRNA.

## ملخص لخطوات تكوين البروتين وأنواعه

هناك خطة مشتركة لتكوين آلاف الأنواع من البروتينات التي توجد في الأنظمة الحية، فهناك عشرون نوعاً من الوحدات البنائية للبروتين هي الأحماض الأمينية، وللأحماض الأمينية العشرين تركيب أساسي واحد حيث يحتوى كل حمض أميني على مجموعة كربوكسيلية  $\text{COOH}$  ومجموعة أمينية  $\text{NH}_2$  يرتبطان بأول ذرة كربون، كما توجد ذرة إيدروجين تعتبر المجموعة الثالثة التي ترتبط بنفس ذرة الكربون، وفيما عدا الحمض الأميني جلايسين  $\text{glycine}$  الذي يحتوى على ذرة إيدروجين أخرى مرتبطة بذرة الكربون الأولى فإن الأحماض الأمينية التسعة عشرة الباقية تحتوى على مجموعة رابعة (R) تختلف باختلاف الحمض الأميني، وترتبط الأحماض الأمينية مع بعضها في وجود الإنزيمات الخاصة في تفاعل نازع للماء بروابط ببتيدية  $\text{peptide bonds}$  لتكوين حامضين أميين مرتبطين ببعضهما ويسمى ثنائي الببتيد  $\text{dipeptide}$  ثم يرتبط حامض أميني ثالث فيسمى ثلاثي الببتيد  $\text{tripeptide}$  ثم يرتبط حامض أميني رابع فيسمى رباعي الببتيد وهكذا حتى تصبح السلسلة مكونة من أحماض أمينية عديدة فتسمى عديد الببتيدات  $\text{polypeptide}$  ويعتبر عديد الببتيدات بوليمر  $\text{polymer}$ .

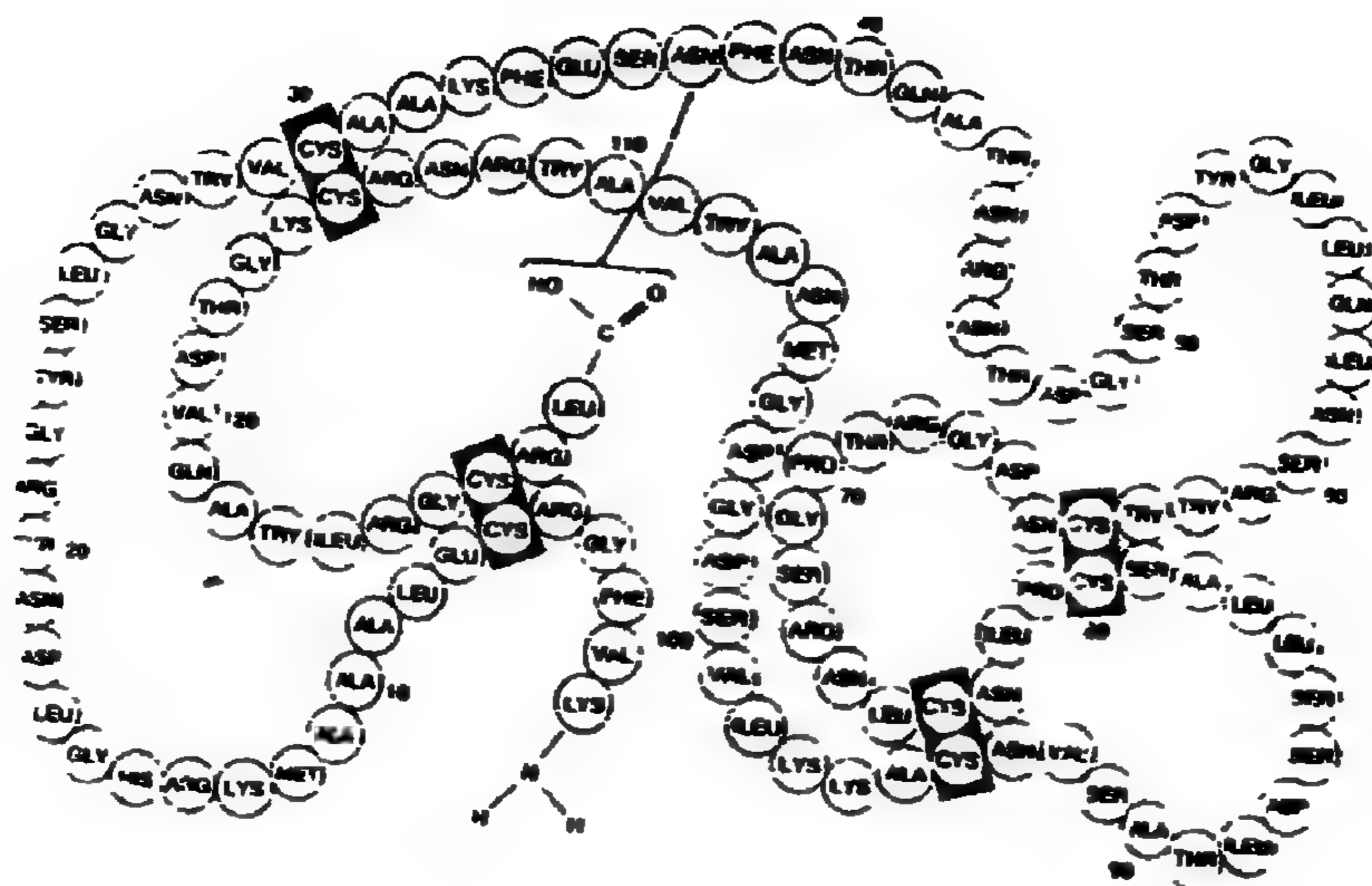


يوجد عديد الببتيد على هيئة شريط ويسمى التركيب الأولي  $\text{primary structure}$  ويكون في هذه الحالة وهو لا يزال متصل بالريبوسوم ثم يحدث بعد ذلك أن بعض أجزاء الشريط تلف حلزونياً ويسمى هذا التركيب  $\alpha\text{-helix}$  ويعتبر في هذه الحالة أنه التركيب الثانوي  $\text{seconday structure}$  للبروتين. يمكن أن يحدث ذلك ولازال عديد

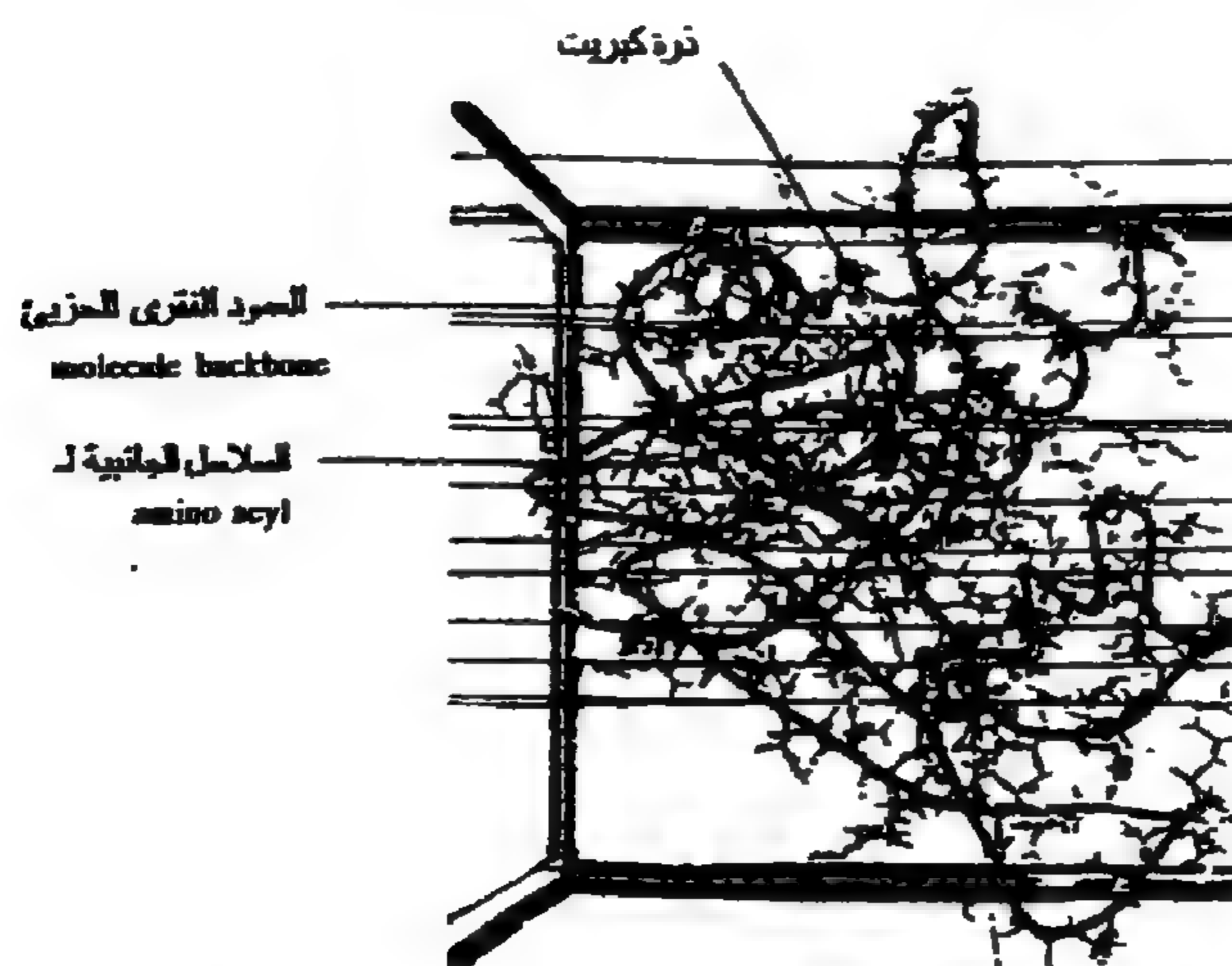


الببتيد متصل بالريبوسوم. ثم يحدث بعد ذلك التركيب الثالثي للبروتين tertiary structure حيث نجد أن جميع أجزاء الجزيء بما فيها 7-helix تلتف على بعضها لتكون بروتين له شكل ذوى ثلاثة أبعاد three dimensional shape وقد أمكن معرفة هذا التركيب بواسطة أشعة X. فى التركيب الثالثي وبعد حدوث الالتفاف تتكون أنواع كثيرة من الروابط وأهمها disulfide bridges والروابط الكارهة للماء hydrophobic bonds والروابط الإيدروجينية hydrogen bonds. وتعمل هذه الروابط على الحفاظ على الالتفاف وشكل البروتين. حيث أنه فى عدم وجود هذه الروابط يمكن أن ينفك الالتفاف فى جزيء البروتين المميز للتركيب الأولي both the secondary and tertiary configuration of a protein are determined solely by its primary structure يمكن أن يتكون التركيب الرباعي للبروتين the quaternary structure of a protein وذلك بإتحاد أكثر من عديد الببتيد أى يكون اثنين أو ثلاثة أو أكثر ويكون لكل عديد الببتيد على حدة التركيب الإبتدائي والثانوى والثالثى الخاص به ومثال ذلك بروتين إنزيم جلوتاميك ديهيدروجينيز.

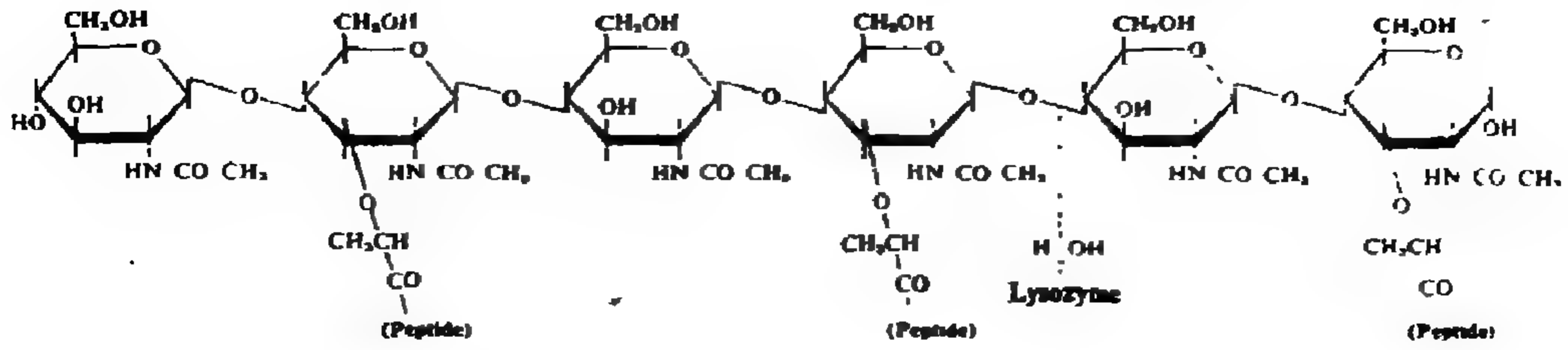
تختلف البروتينات فى ترتيب ونوع وعدد الأحماض الأمينية الداخلة فى التركيب الأولي وأن التركيب الأولي هو الذى يحدد مواصفات التركيب الثانوى والثالثى وأيضاً الرباعي إن وجد. يتضح أن الجينات تتحكم فى التركيب الأولي ولذلك فإن الجينات تتحكم فى تركيب البروتين (شكل ٦٦ و ٦٧) مثل ليروزيم lysozyme وريبونيوكليز.



شكل ٦٦: التركيب الابتدائي لبروتين ليزوزيم lysozyme بياض بيض الدجاج يوضح أربع روابط disulfide bridges بين السستين cysteine. أسماء الأحماض الأمينية مختصرة بالحروف الأولى من كل حامض.



شكل ٦٧: جزيء بروتين ذو ثلاث أبعاد وهو عبارة عن إنزيم **ribonuclease**. العمود الفقري للجزيء وهو سلسلة عديد الببتيدات **polypeptide** عبارة الخط الأسد الثقيل وأما عن السلاسل الجانبية لـ **amin acyl** عبارة عن الخطوط الرفيعة وذرات الكبريت عبارة عن شكل كروي تكون أربعة **disulfide bridges**.



شكل ٦٨: تحطيم أى كسر أى شق أى تحليل جزيء mucopeptide بواسطة إنزيم lysozyme.

يوضح الشكل (٦٨) تكسير جزيء mucopeptide بواسطة ليزوزيم.

توجد أنواع كثيرة من البروتينات فى الكائنات الحية ويكن تصنيفها إلى مجموعتين كما هى:

### ١- البروتينات التركيبية:

#### Structural Proteins:

أى التى تدخل فى تراكيب محددة فى الكائن الحى مثل الأكتين والميوسين الذين يدخلان فى تركيب العضلات وغيرها من أعضاء الحركة، والكولاجين الذى يدخل فى تركيب الأنسجة الضامة، والكيراتين الذى يكون الأغطية الواقية كالجلد والشعر الحوافر والقرون والريش وغيرها.

أما البروتينات الهستونية فهى مجموعة محددة من البروتينات التركيبية توجد فى النواد، والهستونات بروتينات صغيرة تحتوى على قدر كبير من الحمضين الأمينيين القاعديين أرجنين Arginine وليسين Lysine، وتحمل المجموعة الجانبية (R) لهذين الحمضين الأمينيين عند الأس الهيدروجينى (pH) للخلية شحنات موجبة. وعلى ذلك فهى ترتبط بقوة بمجموعات الفوسفات الموجودة فى جزيء DNA والتى تحتوى على شحنات سالبة، وتوجد الهستونات بكميات ضخمة فى كروماتين أى خلية وفائدتها أنها تعمل كوسادة للكروماتين وبذلك تحافظ عليه وتحفظه حيث أن وجود الوسادة يقلل من الأضرار التى تحدث للكروماتين.



## ٢ - البروتينات التنظيمية

### Regulatory Proteins:

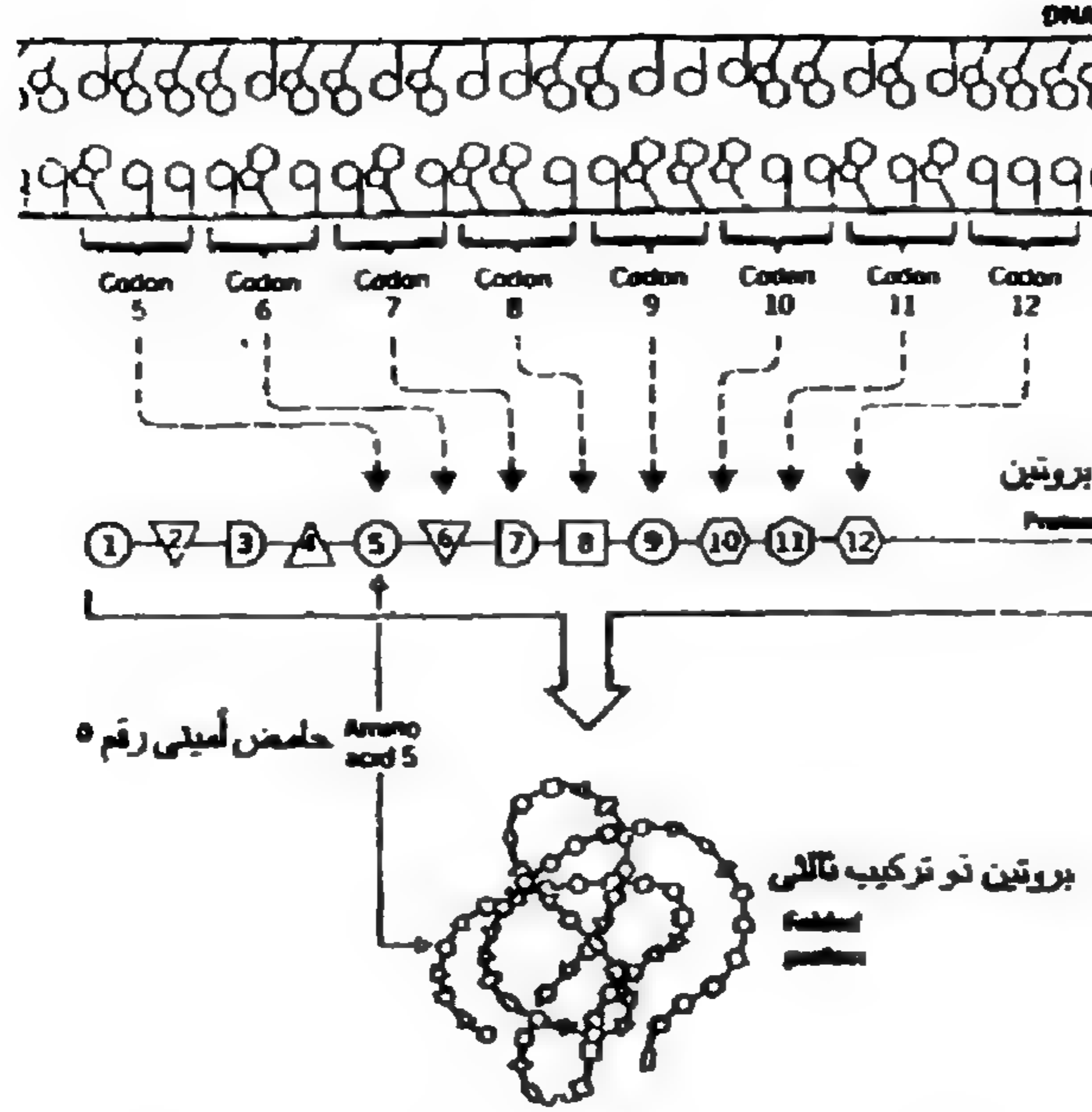
أى التى تنظم العديد من عمليات وأنشطة الكائن الحى، وهى تشمل الإنزيمات التى تقوم بالتفاعلات الكيميائية بالكائنات الحية والأجسام المضادة التى تعطى الجسم مناعة ضد الأجسام الغريبة والهرمونات وغير ذلك من المواد التى تمكن الكائنات الحية من الإستجابة للتغير المستمر فى البيئة الداخلية والخارجية.

وتعزى الفروق بين البروتينات المختلفة إلى الفروق فى أعداد وأنواع وترتيب الأحماض الأمينية فى عديد الببتيدات. كما تعزى إلى عدد عديد الببتيدات التى تدخل فى بناء البروتين بالإضافة إلى الروابط الإيدروجينية الضعيفة التى قد تعطى للجزيء شكله المميز، وعملية تخليق البروتين عملية معقدة تتضمن تداخل العديد من الأنواع المختلفة من الجزيئات وخاصة الإنزيمات.

### ملخص لعملية تخليق البروتين

لتخليق أى بروتين يتم نسخ الشفرة الوراثية له والموجودة على جزيء DNA إلى جزيء RNA الرسول (mRNA) messengerRNA الذى يحمل تلك الشفرة إلى الريبوسومات حيث يتم بناء هذا البروتين. وتحدد الشفرة الوراثية الموجودة على جزيء DNA وبالتالي على جزيء mRNA ترتيب الأحماض الأمينية التى ستكون عديد الببتيد، إلا أن ((كلمة الشفرة)) فى mRNA لا تعرف بشكل مباشر على الحمض الأمينى المقابل ولكنها تحتاج إلى جزيء موصل adaptor هو (tRNA) transfer RNA ناقل. وهناك جزيء tRNA خاص بكل حامض أمينى، ويتربط أحد طرفى هذا الجزيء بالحمض الأمينى الخاص به، كما يوجد على جزء من tRNA تتابع للنوكليوتيدات أى مقابل الكودون يتعرف على ويتزاوج مع تتابع للنوكليوتيدات (كودون) على mRNA وعند قراءة شفرة mRNA من على الريبوسوم فإن جزيئات tRNA تصل بالتتابع وتعطى أحماضها الأمينية إلى سلسلة عديد الببتيد النامية.

وتستخدم جزيئات tRNA المرة بعد الأخرى في نقل الأحماض الأمينية، كما أن جزيئات mRNA يمكن أن تترجم أكثر من مرة لتعطي العديد من نسخ عديد الببتيد الذي تحمله شفرته. ثم يتكون من عديد الببتيد جزيء البروتين. ولذلك يتضح أن الجين أو الجينات تتحكم في تخليق البروتين (شكل ٦٩).



شكل ٦٩: خطوات تخليق البروتين من DNA.

## التثبيط والتوهين وتخلق الأحماض الأمينية والبروتين

لكي يتمكن مهندس الوراثة genetic engineer من تنظيم عملية إنتاج RNA يجب أن يتحكم في كيفية البدء والإنتهاء في عملية الإنتاج حيث أنه إذا لم يمكنه كيف ومن أين يبدأ فستكون عملية إنتاج RNA مختلة وأيضاً إذا لم يمكنه كيف ومتى ينتهي من العملية فسيحدث إختلال في إنتاج RNA. يمكن التحكم في ذلك بواسطة طريقتين وهما المنع والتثبيط repression والتوهين attenuation وقد تم دراسة هاتين الطريقتين بالتفصيل في البكتيريا. تم شرح طريقة المنع بالتفصيل في الجزء السابق وفيما يلي طريقة شرح التوهين.

أما في حالة التوهين attenuation فإنه يتكون شريط قصير من mRNA. درست هذه الحالة دراسة مستفيضة على الجينات التي تقوم بتخليق الأحماض الأمينية. حيث أنه من المعروف أن لابد من وجود توازن في كمية الأحماض الأمينية في الخلية وعددها عشرون وعند وجود حامض أميني بتركيز عال في الخلية فإن الخلية توقف إنتاج هذا الحامض لفترة وبذلك فإنها تدخر وتحفظ الطاقة اللازمة لإنتاج هذا الحامض الأميني الزائد عن حاجة الخلية. أي أنه يوجد حفظ وتنظيم لطاقة الخلية المستعملة في إنتاج الأحماض الأمينية. يحدث ذلك في الخلية عن طريق عملية التوهين. ومثال ذلك حالة التوهين في جينات الحامض الأميني تربتوفان. حيث أن إنزيم RNA polymerase يبدأ في عمل mRNA على بعد مسافة محدودة من بداية أول جين في الرسالة. ينتج عن ذلك ما يسمى RNA القائد leader RNA وهذا الأخير يتكون منه بروتين قصير قائد a short leader protein. ويوجد على RNA القائد كودونات تحتم وجود التربتوفان في البروتين القائد. وفي منطقة القائد leader region (وهي الجزء من DNA الذي يبدأ بمنطقة نشاط RNA polymerase وينتهي عند بداية أول جين في الرسالة) يوجد غشارة وقوف فعالة active stop signal تسمى الموهن attenuator. عند وجود تركيز عال من التربتوفان فإن الريبوسومات

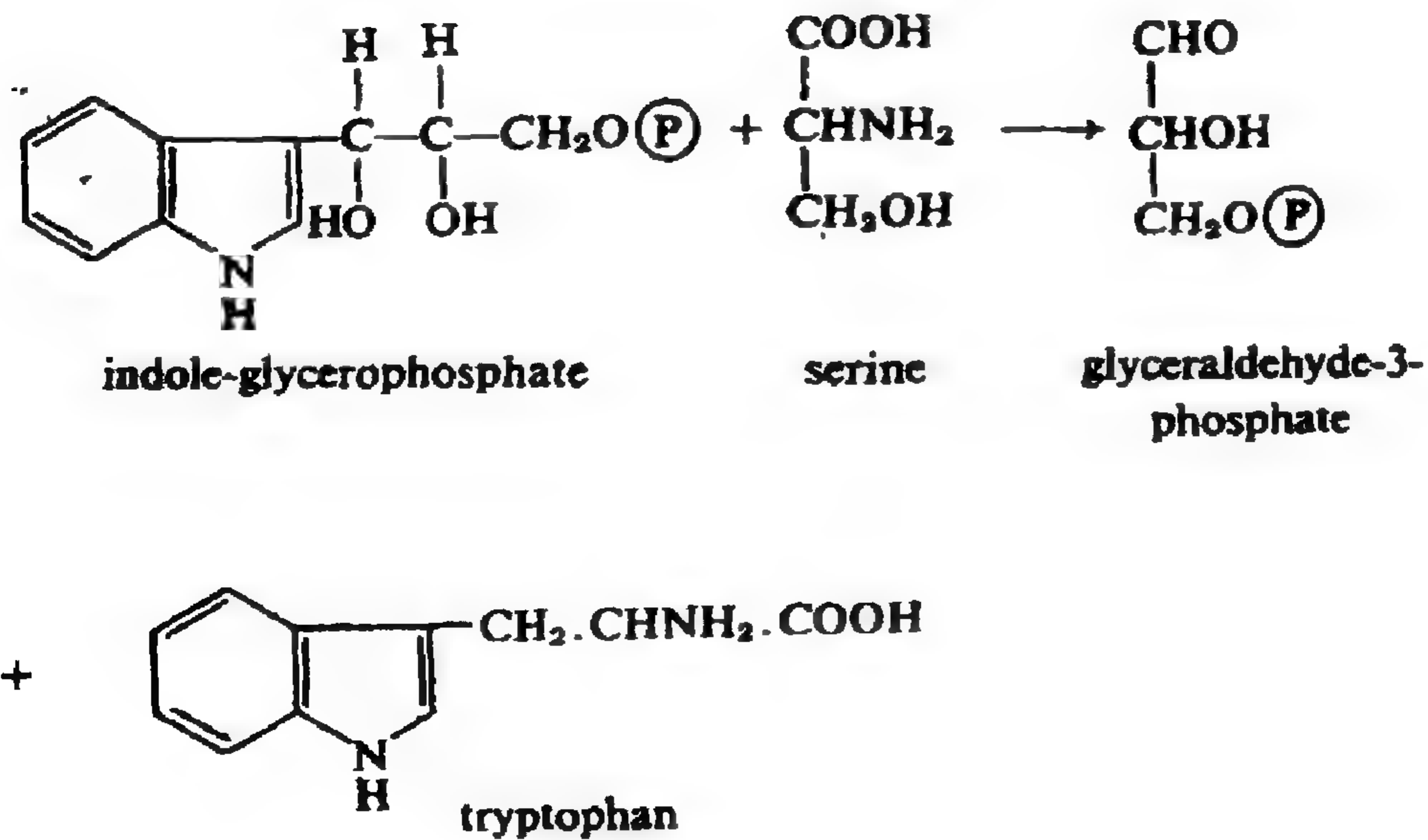


تكون قادرة على تخليق البروتين القائد ونتيجة لذلك فإن منطقة موهن الـ attenuator region of RNA-RNA تنطوى وتلتوى بطريقة معينة وتمنع وتوقف نشاط إنزيم RNA polymerase. وبذلك يتوقف تكوين البروتين الخاص بتكوين وتخليق التربتوفان. ولكن فى وجود ندرة فى تركيز التربتوفان فإن حركة الريبوسوم تتأخر أو تتوقف عندما يصل إلى منطقة كودونات التربتوفان فى RNA القائد اللازم لتكوين البروتين القائد. تأخير أو توقف الريبوسوم يمنع الموهن من تأثيره على وقف نشاط إنزيم RNA polymerase ولذلك ينشط هذا الإنزيم ويستمر فى عمله على جزيء DNA ليكون رسالة كاملة entire message. ويتكون mRNA كامل يحمل كل مواصفات الجينات الداخلة فى تخليق البروتين اللازم لتكوين الإنزيمات اللازمة لتخليق التربتوفان مثل إنزيم تربتوفان سنثيتيز tryptophan synthetase (شكل ٧٠). كل واحد من هذه الجينات له موقعه الخاص على mRNA وله مكان للبداية start site للربط بالريبوسومات خاص به. وهكذا فإن تركيز التربتوفان فى الخلية يتحكم وينظم تخليق التربتوفان.

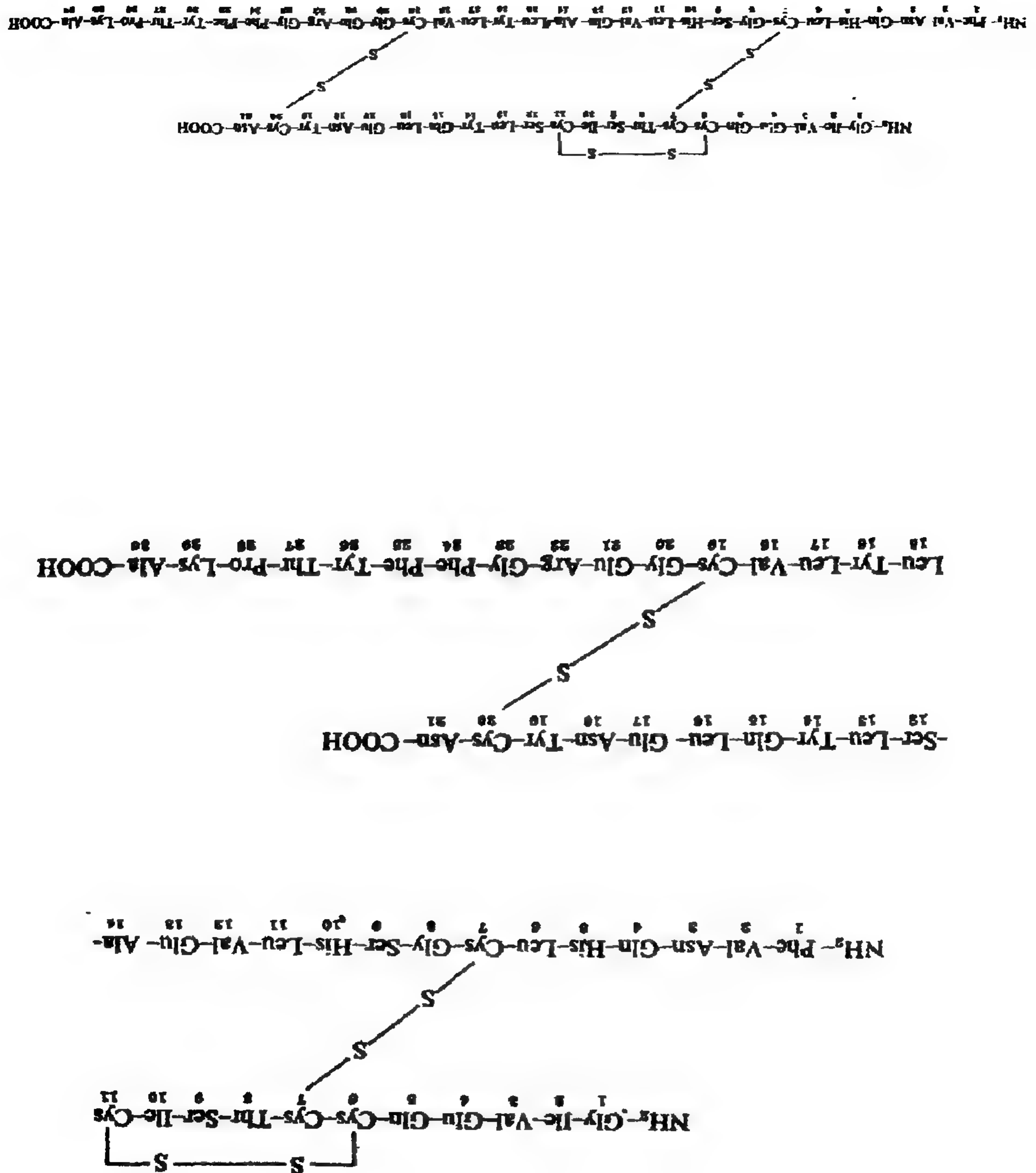
مما سبق يتضح أن المنع والتوهين ما طريقتان هامتان لكى تتحكم الخلية فى إنتاج مركبات لازمة لها وتمنع تكوين مركبات غير لازمة. ومثال لذلك فى الإنسان أو الحيوان أو النبات فإن الخلية تحتوى على جينات كثيرة بعض هذه الجينات يحتاجها الكائن الحى فى فترة من فترات حياته فقط لأنها تتحكم فى إنتاج مركبات معينة مطلوبة فى فترة معينة بينما تكون هذه المركبات غير مطلوبة فى فترة أخرى من الحياة. ولذلك يجب منع الجينات عن إنتاج هذه المركبات ويكون ذلك بالمنع أو التوهين أو كليهما. ومن أمثلة ذلك الإنسان يمكن أن تنطبق عليه هذه القاعدة ففى مرحلة البلوغ تتكون مركبات أو وحدات لا يكونها فى مرحلة الطفولة قد تكون هذه هورومونات معينة أو إنزيمات أو مركبات معينة ففى مرحلة البلوغ فى الذكور تتكون الحيوانات المنوية التى لا تتكون بالطبع فى مرحلة الطفولة أو الصبى.

يعتبر نقل جينات وصفة تخليق الأنسولين (شكل ٧١) من الإنسان إلى البكتيريا

من الإنجازات العظيمة للهندسة الوراثية. ولكن بعد نقل الجينات إلى البكتيريا كيف تتحكم في تنشيط أو منع هذه الجينات من أداء وظيفتها. حيث أنه بعد نقل هذه الجينات إلى البكتيريا فإننا نحتاج أولاً أن نمنع البكتيريا من إنتاج الأسولين لكي تتكاثر بكفاءة عالية وتنتج أعداد هائلة من الخلايا البكتيرية وبعد ذلك ننشط هذه الأعداد الهائلة من الخلايا البكتيرية لإنتاج بروتين الأسولين وبذلك يمكن الحصول على كميات كبيرة من الأسولين وتصبح الطريقة إقتصادية. يمكن التحكم في ذلك بواسطة المنع. حيث يوضع الجين أو الجينات الخاصة بإنتاج الأسولين في DNA البكتيري مباشرة بعد منطقة المانع. وعن طريق إزالة المانع أو وضعه في مكانه يمكن التحكم في إنتاج الأسولين أو منعه وهكذا يمكن التحكم في إنتاج الأسولين أو منعه في الخلية البكتيرية تبعاً للحاجة وتشابه هذه الحالة تحليل المركبات الغذائية المتوفرة أو الغير متوفرة داخل الخلية البكتيرية والتي تتحكم في إزالة أو ربط المانع.



شكل ٧٠: عمل إنزيم tryptophon synthetase في تخليق التربتوفان.



شكل ٧١: تركيب جزئ الإنسولين من بدائي الإنسولين proinsulin في الخنزير بواسطة نشاط الإنزيمات المحللة للبروتين proteolysis.



الباب الخامس

# توطين الجين



## توطين الجين Gene Cloning

(نقله وتسكينه وزيادته في العدد أى إكثاره أى إستنساخه)

من الطرق الهامة فى الهندسة الوائية توطين الجين gene cloning ويمكن تلخيص توطين الجين فيما يأتى:

١ - جزء من جزيء دنا يحتوى على جين مطلوب عزله ونقله، ويتم إدخال هذا الجين فى جزيء دنا حلقى circular DNA molecule يسمى الناقل الوسيط vector. ينتج عن ذلك كيميرا chimaera أى جزيء دنا معاد صياغته recombinant DNA molecule.

٢ - يعمل الناقل الوسيط كوحدة متحركة vehicle حيث يقوم بنقل الجين المرغوب نقله إلى خلية العائل host cell. عادة تكون خلية العائل بكتيريا ولكن قد تكون عوائل أخرى مثل الخميرة.

٣ - يتكاثر الناقل الوسيط فى داخل خلية العائل منتجاً عديد من الوحدات المتماثلة أى عديد من النسخ copies وبذلك تنتج تنتج عديد من النسخ الحاملة للجين المطلوب.

٤ - عند تكاثر خلية العائل فإنه ينتقل إلى النسل جزيء دنا معاد صياغته وبالتالي فإن إنقسامات عديدة للناقل الوسيط يتم حدوثها.

٥ - بعد عديد من إنقسامات خلية العائل فإنه يتكون مستعمرة colony أى وحدات متماثلة تماماً clone. كل خلية فى المستعمرة تحتوى على واحد أو عديد من نسخ جزيء دنا معاد صياغته. وفى هذه الحالة فإن الجين تحت الدراسة أى المطلوب نقله بواسطة جزيء دنا المعاد صياغته يطلق عليه تم توطينه to be cloned. زيادة الجين المطلوب فى العدد يسمى إستنساخ.

يفصل المؤلف كلمة توطين الجين gene cloning عن كلمة الإستنساخ حيث أن



الجين المطلوب يتم عزله ونقله وإكثاره وزيادته عددياً أى تكراره. حيث أن عملية التوطن في الإنسان هي نقله مجموعة قليلة من مكان إلى آخر وفي المكان الأخير تستقر المجموعة وتتزاوج وتتناسل لتكون عشيرة كبيرة أو كبيرة جداً في مكان جديد مثلما يحدث في توطين البدو في مكان معين أو توطين بعض المزارعين من الدلتا إلى الأراض المستصلحة حديثاً نسبياً وأيضاً نشوء أستراليا وأمريكا. فهذا التوطن يماثل توطين الجين من حيث نقله وإستقراره في عائل جديد ثم زيادته في العدد بدرجة كبيرة. عامة يفضل المؤلف كلمة توطين الجين عن كلمة إستنساخ الجين.

### **إستخلاص وتنقية دنا من الخلايا الحية**

#### **Purification of DNA From Living Cells**

يحتاج مهندس الوراثة إلى تحضير دنا وذلك بإستخلاصه وتنقيته من الخلايا الحية. أولاً يحتاج تحضير دنا الخلية وهذا الدنا المستخلص من الخلية يحتوى على الجينات المطلوب توطينها. ولذلك يستخلص هذا الدنا من خلية نبات أو بكتيريا أو حيوان أو إنسان ألخ المطلوب دراسة جيناتها. ثانياً تنقية البلازميدات من الخلية وذلك بفصل البلازميدات من مزارع البكتيريا وتعبر خطوة لتنقية البلازميدات من دنا الكلى للخلية. أى أولاً يتم تنقية دنا الخلية الكلى ثم يتم فصل دنا البلازميدات من دنا الخلية الكلى أى يتم فصل دنا البلازميدات من دنا الكروموسومى. ثالثاً أحياناً يحتاج مهندس الوراثة إلى تنقية الفاج. عادة يكون تنقية دنا الفاج بنزع الغلاف البروتينى capsid ولكن أحياناً يتم تنقية الفاج من خلايا البكتيريا وهذا نادراً ما يحدث. وهذه الحالة النادرة مثل حالة M13 ذو الخيطين أى الشريطين ds replicative form.

### **أولاً – تنقية دنا الخلية الكلى**

#### **Preparation of Total Cell DNA**

لتحضير دنا الخلية الكلى من الإنسان أو الحيوان أو النبات يكون أسامياً واحد

ولكن مع إختلافات بسيطة أو متوسطة فى كل حالة. وحيث أن البكتيريا تستعمل بكثرة فى هذا الصدد فسيتم شرح كيفية إستخلاص دنا من البكتيريا.

### **١ - تنمية البكتيريا على بيئات خاصة ثم يتم فصلها عن البيئة وتجميعها.**

يمكن تنمية البكتيريا على بيئات خاصة عديدة أهمها بيئة الآجار المغذى nutrient agar أو بيئة المرق المغذى nutrient broth. حيث أن بيئة الآجار تعتبر شبه صلبة لإحتوائها على الآجار أما بيئة المرق المغذى فإتفا سائلة لعدم إحتوائها على الآجار. يشترط فى تركيب البيئة ما يأتى:

أ - تحتوى على مصدر للكربون مثل السكروز أو الجلوكوز.

ب - تحتوى على مصدر للأزوت مثل النترات.

ج - تحتوى على أملاح وهى مصدر للعناصر المغذية الضرورية.

د - تحتوى على مصدر للأحماض الأمينية مثل البيبتون أو التربتون.

هـ - تحتوى على مصدر للفيتامينات مثل الثيامين ومثل مستخلص الخميرة.

يجب أن يكون للبيئة pH معينة مناسبة لنمو البكتيريا. يتم تنمية البكتيريا على أحد البيئات المناسبة فى درجة حرارة مناسبة، يمكن أيضاً وضع الدوارق المخروطية النامية عليها البكتيريا على هزاز shaker وتغذيتها بالهواء وذلك على سرعة ١٥٠ - ٢٥٠ r.p.m يتم جمع الخلايا البكتيرية من الدوارق المخروطية وذلك بترسيبها على هيئة راسب فى قاع أنبوبة جهاز الطرد المركزى.

### **٢ - تحضير مستخلص الخلية:**

#### **Preparation of cell extract:**

لتحضير مستخلص الخلية لابد من فصل جدار الخلية عن البروتوبلازم. يمكن كسر جدار خلية البكتيريا بطرق عديدة منها طرق ميكانيكية وطرق كيميائية. لكن المعتاد إستعمال الطرق الكيميائية فى هذا الصدد. يتم تكسير جدار الخلية بواسطة إنزيم lysozyme أو بواسطة ethylene diaminetetra acetate (EDTA) أو كليهما.

يعتبر الليزوزيم إنزيم موجود في بياض البيض وفي الدموع واللعاب وهو يسبب هضم جدار الخلية المسئول عن صلابة الخلية. يسبب EDTA خلب أى إزالة أيونات المغنيسيوم اللازمة لحفظ تركيب جدار الخلية كما يسبب أيضاً تثبيط إنزيمات الخلية المحللة لدنا. في بعض الأحيان تكون إحدى هاتين المعاملتين تكون كافيتان لطراوة جدار الخلية وإنبثاق وخروج البروتوبلازم.

ولكن عادة تحتاج إلى مركب إضافي وهو منظف detergent مثل sodium (SDS) dodecyl sulphate. تساعد المنظفات في تحليل الخلايا بإزالة الدهون وبذلك تسبب انفجار غشاء الخلية. يتم فصل البروتوبلازم عن الجدار بواسطة الطرد المركزي المناسب.

### ٣ - تنقية دنا مستخلص الخلية

#### Purification of DNA from cell extract

يتكون مستخلص الخلايا من بروتين ورنا ودنا أساساً ولذلك لابد من إزالة البروتين ورنا من المستخلص. الطريقة المثلى لإزالة البروتين من المستخلص هو إضافة الفينول أو مخلوط من الفينول والكلوروفورم بنسبة ١:١ هذه المذيبات العضوية ترسب البروتين ولكنها تترك الأحماض النووية رنا ودنا كما في المحلول المائي. يتم فصل البروتين عن الأحماض النووية بالطرد المركزي حيث سيرسب البروتين وتبقى الأحماض النووية في المحلول المائي وحيث يمكن أخذ الأخير بماصة. أحياناً تكون كمية البروتين كبيرة في الخلية وفي هذه الحالة لابد من معاملة البروتوبلازم بواسطة إنزيمات بروتينير protease لتحليل البروتين ثم إضافة الفينول ثم الطرد المركزي.

بعض أنواع رنا خاصة رنا رسول يمكن أن تزال بالمعاملة بالفينول ولكن الغالبية العظمى تبقى في المحلول المائي ولذلك فإن أفضل طريقة لذلك هو إزالة رنا بواسطة إنزيم ريبونوكلييز RNase.



#### ٤- تركيز عينات دنا

##### Concentration of DNA sample:

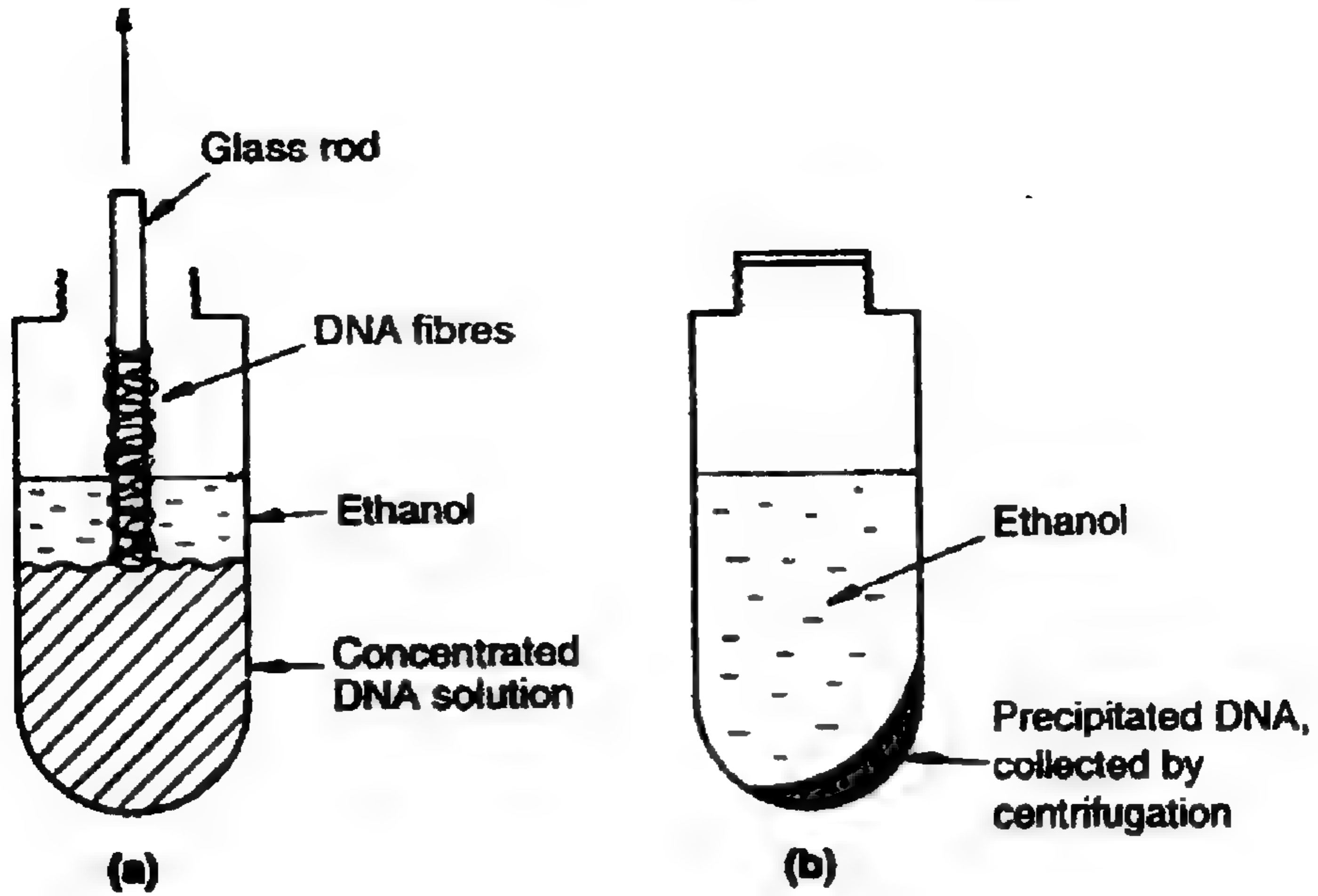
أحياناً كثيرة يكون دنا الناتج مركز بدرجة كبيرة ولكن أحياناً أخرى يكون فى محلول مائى ويجب تركيزه. ومن أهم هذه الطرق هى الترسيب بكحول الإيثيل. فى وجود ملح مثل كلوريد صوديوم أى فى وجود كاتيون أحادى مثل الصوديوم ودرجة حرارة -٢٠م أو أقل وكحول إيثيل مطلق يحدث ترسيب دنا. فى حالة محلول دنا الغليظ فإن الإيثانول يطفو على السطح ويبقى دنا فى القاع ويمكن إدخال قضيب زجاجى على السطح الفاصل بين الإيثانول ودنا وسحب القضيب. يتم تجمع دنا عليه ويتم الشد وخروج دنا على هيئة خيط (شكل ٧٢). توجد طريقة أخرى لفصل دنا فى المحلول المخفف وهى خلط الإيثانول مع دنا ثم الفصل بوساطة الطرد المركزى وبالطبع سيرسب دنا.

#### ٥- قياس تركيز دنا

##### Measurement of DNA concentration:

يمكن قياسه بسهولة بجهاز تحليل الألوان ذو الأشعة فوق البنفسجية ultra violet spectrophotometer. يتم قياس تركيز دنا عند طول موجة ٢٦٠ نانومتر حيث يحدث أقصى امتصاص لهذه الأشعة عند هذا الطول بواسطة دنا. عادة درجة الإمتصاص absorbance الواحدة (A260) أى درجة تساوى وجود ٥٠ ميكروجرام من ds DNA دنا ثنائى الشريط أى ثنائى الخيط أو الحلزون.

يمكن أيضاً استعمال الأشعة فوق بنفسجية فى الحكم على نقاوة حيث تكون النسبة للإمتصاص على طولى موجة مختلفين هما ٢٦٠، ٢٨٠ نانومتر A260/A280 تكون النسبة ١,٨ للنقى ولكن النسبة أقل من ذلك فى حالة التحضير الملوث بالفينول أو البروتين أو كليهما.



شكل ٧٢: جمع دنا بواسطة الترسيب بالإيثانول:

(a) يتم وضع طبقة من كحول الإيثانول المطلق على قمة محلول مركز من دنا. ألياف دنا يمكن سحبها بواسطة قضيب زجاجي.

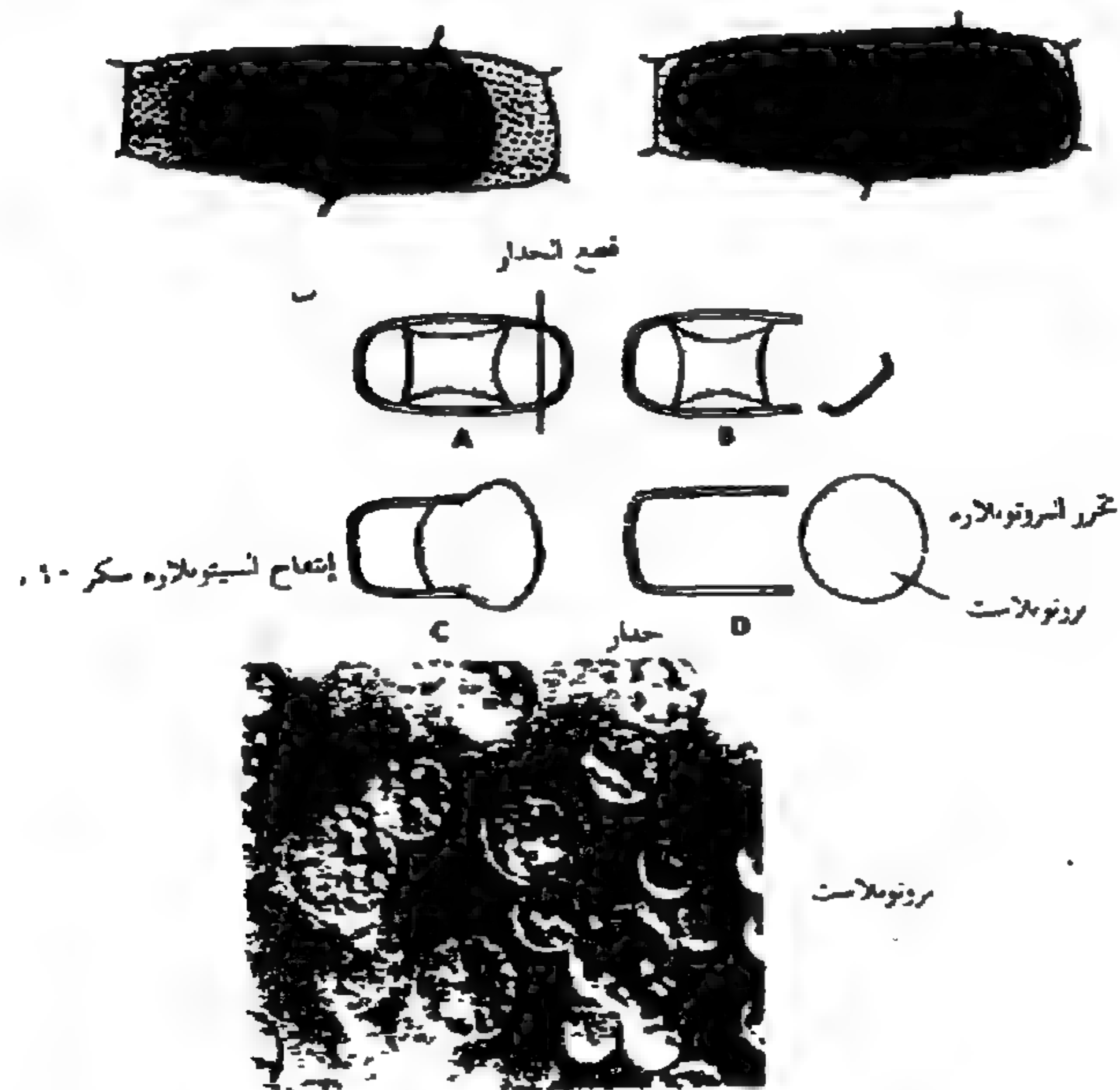
(b) في حالة المخاليل الأقل تركيز من دنا (منخفضة التركيز) يضاف الإيثانول بنسبة ٢,٥ جم كحول مطلق إلى ١ حجم محلول دنا ثم يتم ترسيب دنا بواسطة الطرد المركزي.

#### ٦ - تحضيرات أخرى خلافا للبكتيريا

##### Preparation of total cell DNA from organisms other than bacteria

قد يكون إستخلاص دنا من خلية نبات أو خلية حيوان أو خلية إنسان وتختلف الطرق المستعملة في ذلك نسبياً عما سبق. مثال ذلك أن خلية الحيوان والإنسان ليس لها جدار خلوي ويمكن تحليلها بسهولة جداً دون إحتياج للمركبات السابق ذكرها في البكتيريا ويكفى معاملتها فقط بمنظف detergent. والعكس صحيح في خلايا النباتات حيث أن لها جدار خلوي صلب ولكن يختلف في تركيبه عن الجدار الخلوي في البكتيريا ولذلك لا يصلح الليزوزيم في خلايا النبات ويمكن أن يستعمل بدلاً منه

مخلوط من إنزيمات محللة للسيليلوز والمركبات البكتينية a mixture of cellulolytic and pectolytic enzymes. ويمكن أن تباع تجارياً بأسماء عديدة. يمكن استعمال خليط من الإنزيمات المحللة للسيليلوز. يمكن أيضاً عزل البروتوبلاست عن جدار الخلية بطريقة أخرى غير الإنزيمات وذلك بعمل بلزمة مبتدئة للخلايا بواسطة محلول مناسب مثل المانيتول mannitol أو السربتول sorbitol بتركيز مناسب حوالى ١١-١٣% وعند إبتعاد البروتوبلازم عن جدار الخلية يتم قطع الجدار بواسطة موس حاد بواسطة بينوكلر أو بإستعمال موس موجود فى جزء يشبه العدسة المكبرة micromanipulator وبذلك يمكن فصل جزء من الجدار تماماً ثم ينتفخ البروتوبلاست ويتحرر من الجدار وبذلك يصبح البروتوبلاست حر (شكل ٧٣). لا تصلح هذه الطريقة إلا فى الخلايا كبيرة الحجم مثل خلايا بشرة بصلة البصل وغيرها.



شكل ٧٣: خطوات فصل البروتوبلاست من الجدار بطريقة البلزمة المبتدئة (فصل ميكانيكى) فى خلية من نبات البصل.  
(أ) خلية بها بلزمة مبتدئة.

(ب) خطوات فصل البروتوبلاست (A, B, C, D).



فى أثناء إجراء عملية البلزمة وقطع الجدار وأثناء تحرر البروتوبلاست من الجدار تتكون حويصلات حيث ينبعج غشاء الإكتوبلاست للداخل مكوناً حويصلات صغيرة وهذه الحويصلات تنفصل عن غشاء الإكتوبلاست وتصبح موجودة بداخل الخلية ويوجد نوعين من الحويصلات هما:

Plasmolytic vesicles وهى التى تتكون أثناء حدوث عملية البلزمة المبتدئة.

Pinocytotic vesicles وهى تتكون فى أثناء الخطوات التى تلى ذلك.

مما سبق يتضح أن البروتوبلاست العارى عديم الجدار يمكن أن يتميز بخاصية الخلية الحيوانية وهى تكوين الحويصلات وإنتقالها إلى داخل الخلية.

كما وجد أيضاً أن للبروتوبلاست العارى للخلايا يمكنه أن يلتقم جزيئات صلبة مثل ferritin و thorium وجزيئات الفيروس وتصبح هذه الجزيئات موجودة بداخل الخلايا.

وقد يمكن تطبيق هذه الظاهرة إقتصادياً حيث تجرى محاولات لجعل الخلايا تلتقم بكتيريا العقد الجذرية وبذلك تثبت هذه الخلايا النيتروجين الجوى وبذلك تتمتع هذه الخلايا بصفة موجودة فقط فى نباتات العائلة البقولية دون نباتات العائلات الأخرى. لكن حتى الآن لم ينجح أحد فى عمل ذلك. يمكن الآن عمل هذه الحويصلات صناعياً من lipoproteins.

يختلف البروتوبلاست فى شكله وحجمه ولونه تبعاً لنوع الخلايا المأخوذة منها ففي حالة الخلايا الكلورانشيمية يكون البروتوبلاست لونه مخضر وبه فجوة عصارية واضحة، وفى حالة الخلايا الملونة أو بتلات الأزهار فإن البروتوبلاست يكون ملون، وفى حالة خلايا البشرة فإن البروتوبلاست يكون غير مخضر ويختلف حجم البروتوبلاست باختلاف نوع الخلايا المأخوذ منها.

ومما هو جدير بالذكر أنه فى كثير من الحالات فى مزارع البروتوبلاست يكون البروتوبلاست شديد الدرة على تكوين جدار خلوى ويتكون هذا الجدار بسرعة كبيرة

وهذه أحد الصعوبات التي توجد في مزارع البروتوبلاست حيث أنه بعد إزالة الجدار فإن البروتوبلاست يكون جدار خلوي بسرعة كبيرة نسبياً وتصبح خلية بدلاً من البروتوبلاست. يمكن أيضاً عمل تزاوج بين بروتوبلاست وآخر وفي بعض الحالات يحدث التزاوج بين بروتوبلاست وآخر بسهولة كبيرة وذاتياً وبسرعة كبيرة.

ولكن في بعض الحالات يحدث التزاوج بين البروتوبلاست بصعوبة نسبياً وفي هذه الحالة نحتاج إلى إضافة نترات الصوديوم حيث تساعد على التزاوج بين البروتوبلاست، ولكن يستعمل في الأغراض العملية وبكفاءة كبيرة مركب البولي إيثيلين جليكول polyethylene glycol حيث أن هذا المركب له كفاءة عالية في المساعدة على تزاوج البروتوبلاست.

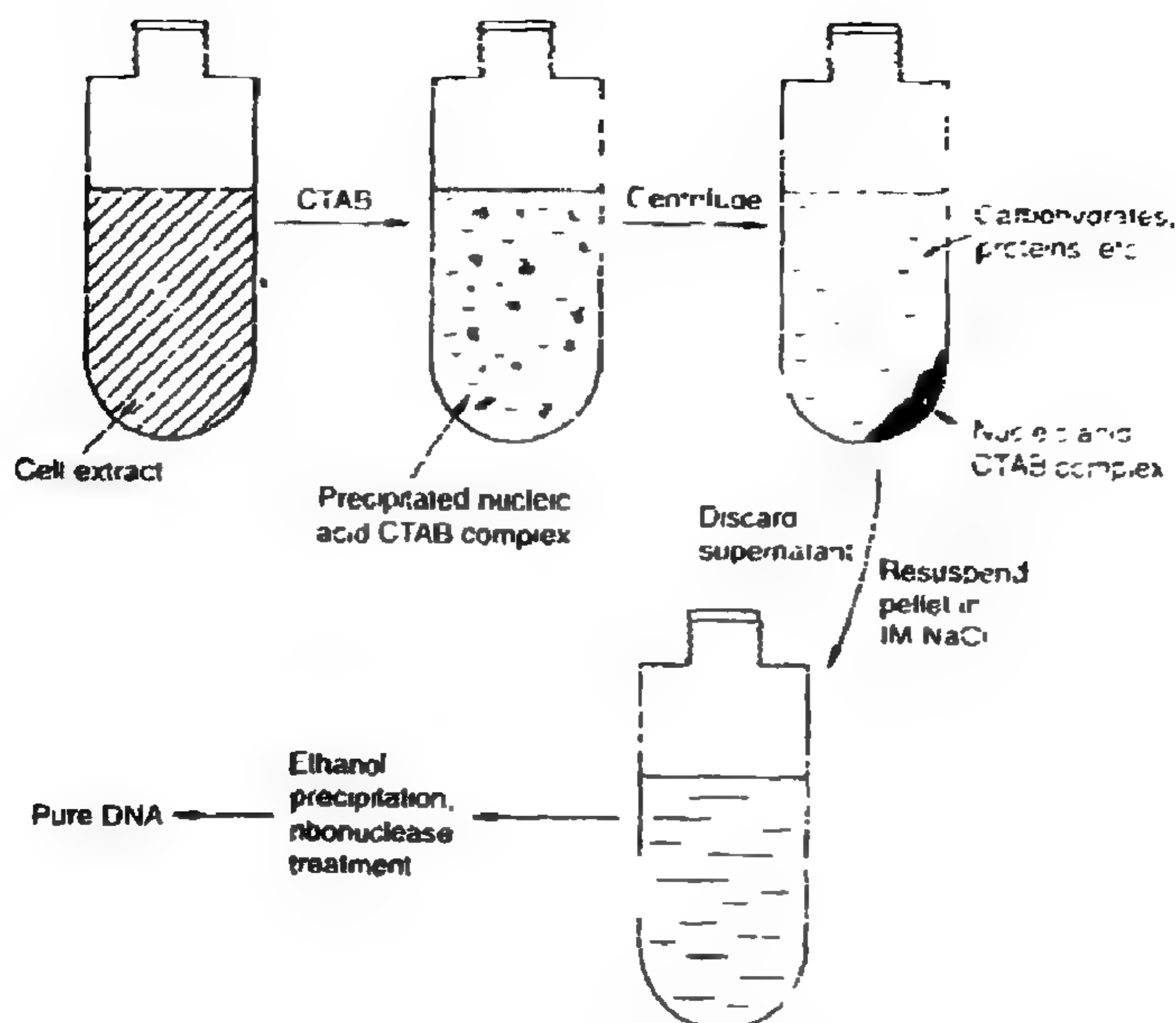
وعامة التزاوج بين البروتوبلاست نفس النبات يكون أسهل من التزاوج بين بروتوبلاست نباتين من صنفين مختلفين أو من نوعين مختلفين أو من جنسين مختلفين.

### **التطبيق الإقتصادي لظاهرة تزاوج البروتوبلاست**

يمكن تطبيق ظاهرة تزاوج البروتوبلاست إقتصادياً وقد أجريت تجارب في هذا الصدد فمن المعروف أن مرض التبقع البني في الفول المتسبب عن الفطر *Botrytis fabae* يسبب خسائر جسيمة في كثير من الدول التي تزرع نبات الفول ومنها مصر. ولا يوجد أصناف مقاومة بالمعنى المفهوم لهذا المرض في الفول العادي *Vicia faba*. ولكن وجد أن French beans وأسمها العلمي *Vicia narobensis* فيها صفة المقاومة لهذا المرض فعند عمل التهجين بين بروتوبلاست من *Vicia faba* وبروتوبلاست من *Vicia narobensis* يمكن الحصول على بروتوبلاست وبالتالي نبات مقاوم لمرض التبقع البني في الفول حيث أن التهجين بين هذين النوعين بالطريقة العادية يحتاج إلى وقت كما إنه صعب الحصول.

في حالة خلية النبات تحتوي على مركبات أخرى إضافية وأهمها وجود كميات

كبيرة من المواد الكربوهيدراتية والتي لا يمكن إزالتها بالفينول. يمكن إضافة منظف مناسب detergent cetyltrimethylammonium مثل (CTAB) (شكل ٧٤).



شكل ٧٤: طريقة CTAB لتنقية دنا من الخلايا النباتية.

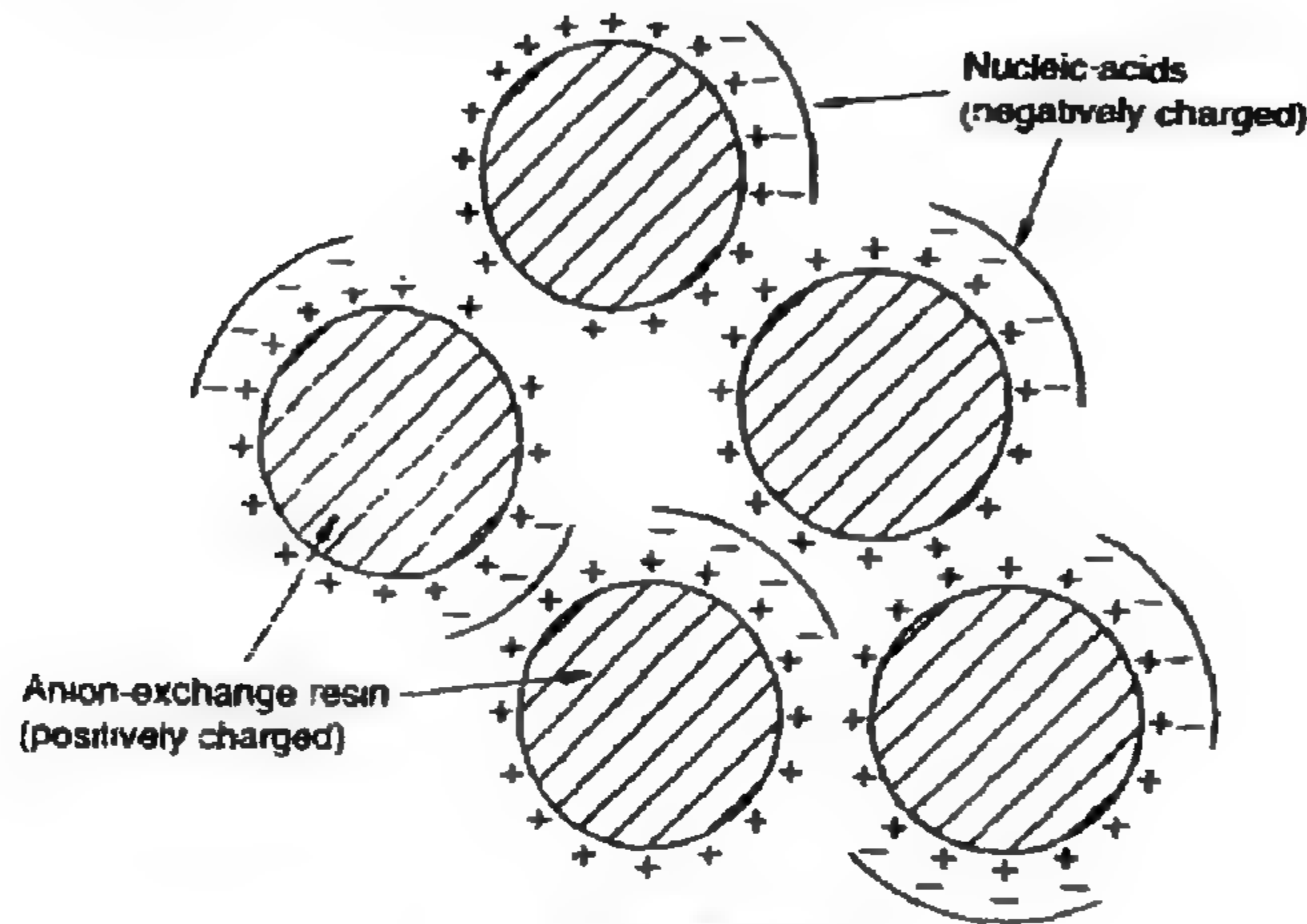
والذى يكون مركب معقد غير قابل للذوبان مع الأحماض النووية يمكن فصله عن البروتين والكربوهيدرات كراسب فى حالة استعمال الطرد المركزى. ثم يتم جمع الراسب ونشره فى محلول جزيئى من كلوريد الصوديوم وذلك بسبب كسر المركب المعقد. ثم يتم ترسيب الأحماض النووية بواسطة الإيثانول ويتم إزالة رنا بواسطة المعاملة بإنتزيم RNase.

طريقة أخرى وهى أن الأحماض النووية عادة تكون سالبة الشحنة وهذا يعنى أن الأحماض النووية ترتبط مع الأسطح الموجبة الشحنة ويمكن استخدام ذلك لفصلها بواسطة anion-exchange chromatography resin (شكل ٧٥)، أحد هذه الحالات هى إضافة الراتنج resin مباشرة لمستخلص الخلية ولكن يفضل استعمال عمود كروماتوجرافى (شكل ٧٥) حيث يتم وضع الراتنج فى العمود ثم يضاف مستخلص الخلية. ترتبط الأحماض النووية السالبة الشحنة بالراتنج الموجب الشحنة وتبقى

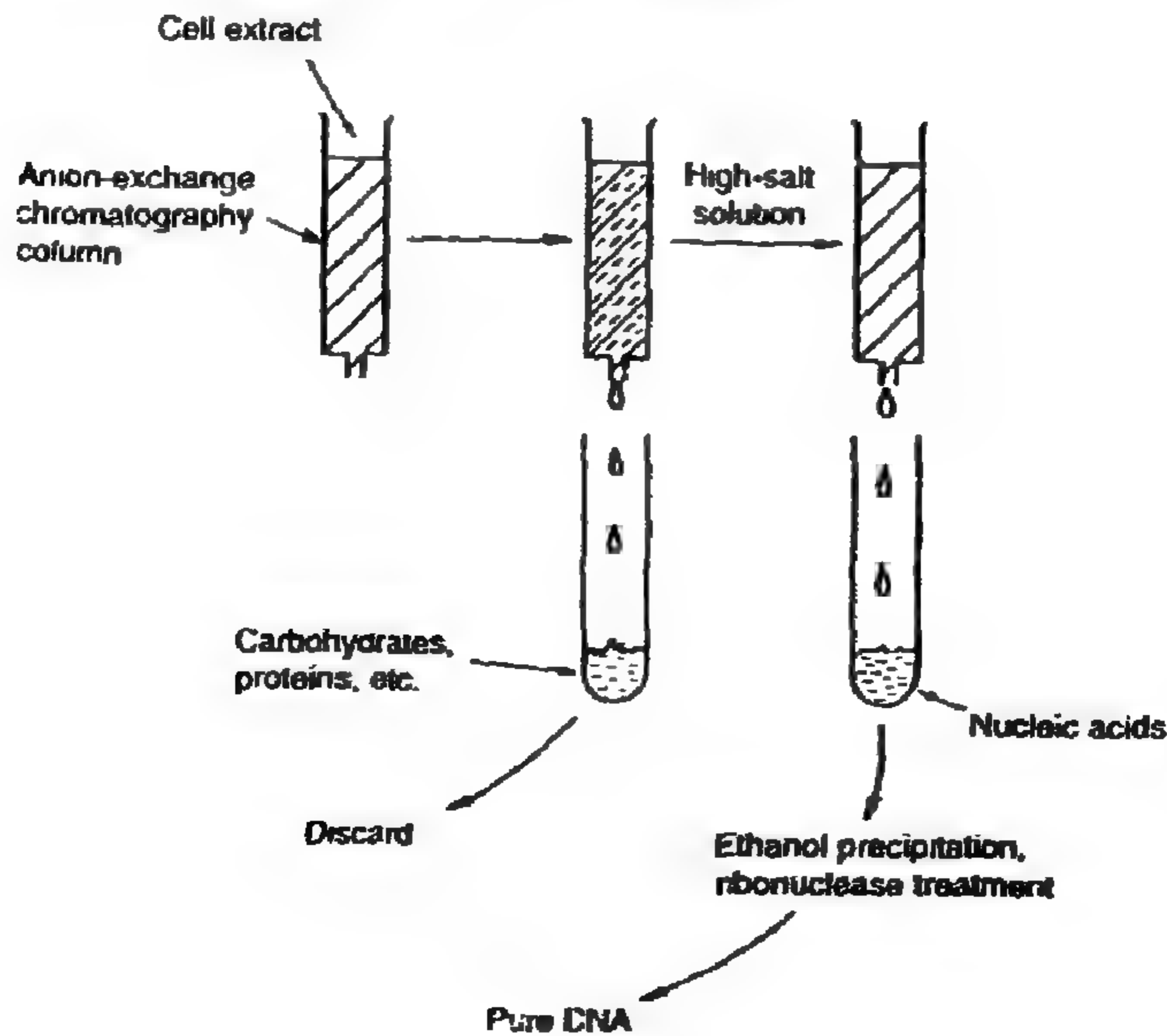


محتجزة بالعمود بينما الملوثات الموجبة والمتعادلة تمر بسهولة من العمود بعد غسل الملوثات من العمود تماماً يتم إضافة محلول ملحي high-salt solution والذي يسبب اختلال الإيزان للإرتباط الإلكتروستاتيكي بين الحامض النووي والراتنج. يمكن بذلك غسل الأحماض النووية بسهولة من العمود ثم يتم ترسيبها بالإيثانول ثم يتم إزالة رنا بإستعمال RNase وبالتالي يوجد لنا نقي.

(a) Attachment of nucleic acids to an anion-exchange resin



(b) DNA purification by column chromatography



شكل ٧٥:

(a) تنقية دنا بواسطة anion exchange chromatography.

(b) تنقية دنا بواسطة column chromatography.

## ثانياً – تنقية البلازميد (تنقية دنا)

## Preparation of Plasmid DNA

الخطوات المتبعة في تحضير البلازميدات هي تماماً كما سبق شرحه في تحضير دنا الكلى من الخلية ولكن بعد ذلك توجد خطوات إضافية لعزل البلازميد أى دنا البلازميد من دنا الكلى للخلية. توجد خاصيتين هامتين يمكن على أساسهما فصل البلازميد وهما حجم البلازميد حيث أن أكبر بلازميد لا يتعدى ٨% من حجم الكروموسوم البكتيرى والخاصية الثانية أن البلازميد حلقى أما دنا الأخرى شريطية أى خيطية ولكن الكروموسوم البكتيرى حلقى ولكن أثناء تحضير وإستخلاص دنا الكروموسوم من الخلية عادة يتمزق الكروموسوم أو يقطع أو ينكسر إلى شريط طولى أو شرائط طولية ولذلك فإن الطريقة المناسبة لعزل البلازميد الحلقى من الجزيئات الشريطية تكون فعالة.

## ١- الفصل على أساس الحجم Separation on the basis of size:

فى هذه الحالة تكون طريقة تحضير دنا الكلى من الخلية مختلفة نوعاً. حيث أن كسر الخلية يجب أن يكون برقة جداً ليمنع كسر وتجزئىء دنا الكروموسوم إلى قطع صغيرة وبذلك يصعب فصل البلازميد عن دنا الكروموسوم بالطرد المركزى. وفى حالة البكتيريا إ. كولاى يجب عمل كسر محكوم ومضبوط ومتحكم به بقدر. المعاملة بالليزوزيم و EDTA تحدث فى وجود السكروز والذى يمنع الخلية من الانفجار ولذلك يتكون شكل كروى غير منفجر يسمى الجسم الكروى sphaeroplast. وهذا الجسم الكروى يتميز بأن الجدار مفتت أو مكسور إلى أجزاء ولكن الغشاء البلازمى (البلازماليمما أى الإكتوبلاست) سليم تماماً. يجرى عمل تحليل للجسم الكروى بواسطة منظف غير أيونى non ionic detergent مثل تريتون X-١٠٠ (triton x-100) حيث أن المنظفات الأيونية ionic detergent مثل SDS تسبب تكسير الكروموسوم. وبذلك فإن هذه الطريقة تكون مناسبة جداً لعدم تكسير الكروموسوم إلى أجزاء صغيرة

ولذلك عند عمل الطرد المركزي يرسب الكروموسوم ويصبح الجزء العلوى أى cleared lysate حلوى للبلازميد.

## ٢ - الفصل على أساس الشكل والتركيب Separation on the basis of conformation:

أغلب البلازميدات توجد فى صورة حلزونة زائدة supercoiled فى الخلية ولذلك ليست من الصحيح القول بأن البلازميدات حلقيّة. تحدث الحلزونة الزائدة supercoiling لأن الحلزونين المكونين للبلازميد تكون جزئياً مفكوكة partially unwound أثناء تخليق البلازميد بواسطة إنزيمات topoisomerases. تستمر حالة الحلزونة الزائدة مع البلازميد لو أن الحلزونين سليمين غير مقطوعين وتسمى فى هذه الحالة covalently closed circular DNA (ccc).

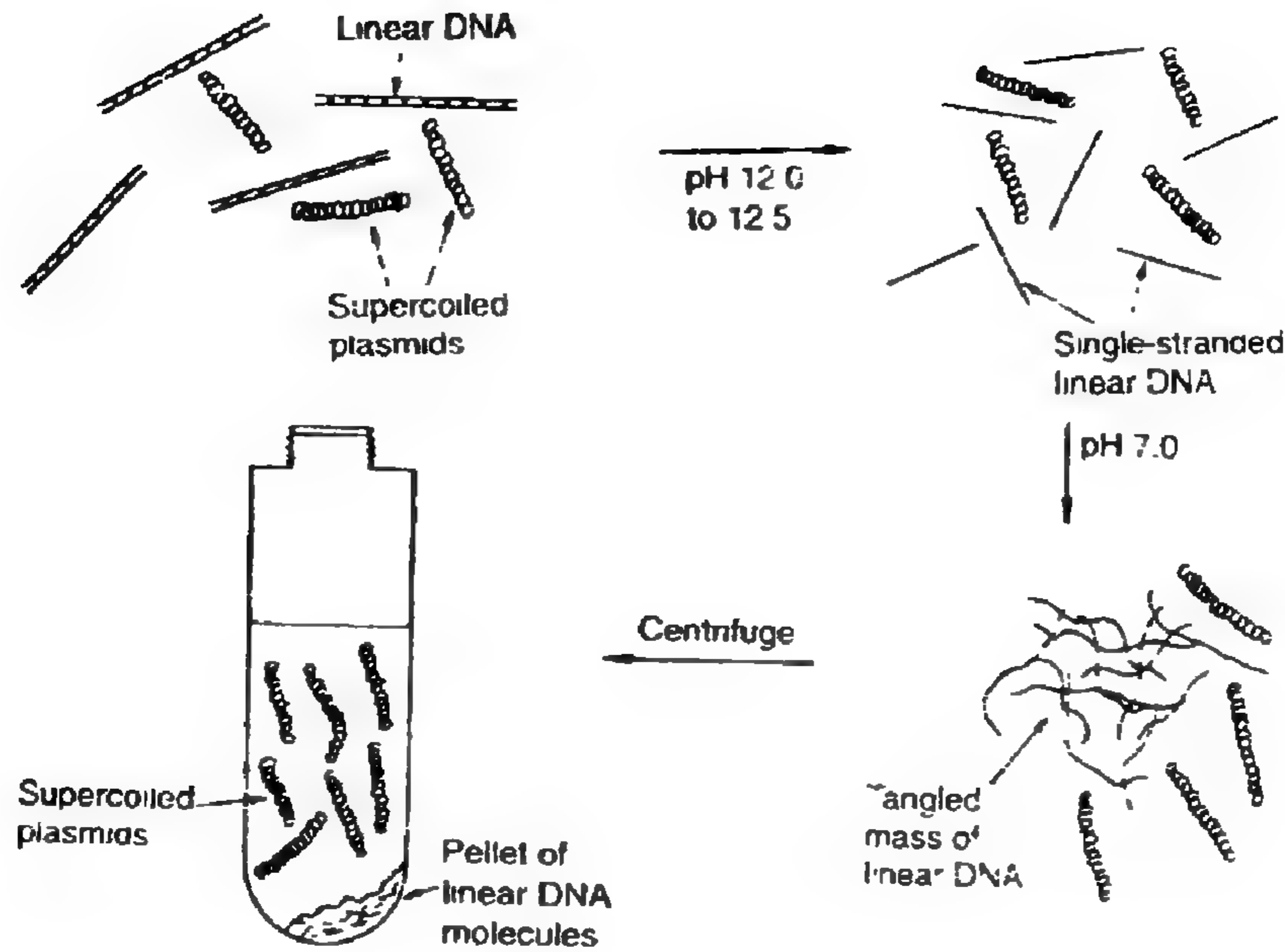
فى حالة كسر أحد الحلزونين فى مكان واحد على الأقل سيحدث لذلك إرتخاء لكلا حلزونى لنا relaxation وتصبح فى الحالة الطبيعية حالة الإرتخاء relaxed state ولذلك فإن البلازميد سيأخذ شكل آخر ويسمى الحلقة المفتوحة open-circular (oc).

## أ - النترة القلوية Alkaline denaturation:

أساس هذه الطريقة أنه يوجد مدى ضيق لـ pH فيه دنا العادى يحدث له ننترة بينما البلازميدات وهى عادة زائدة الحلزونة supercoiled لا تحتوى هذه الصفة. عند إضافة إيدروكسيد الصوديوم إلى مستخلص الخلايا أو إلى الرائق cleared lysate المحتوى البلازميدات وضبط pH عند ١٢ إلى ١٢,٥ ونتيجة لذلك يحدث كسر للروابط الإيدروجينية فى دنا العادى ولا يحدث فى البلازميد زائد الحلزونة ونتيجة لذلك ينفصل حلزونى لنا عن بعضهما ثم يضاف بعد ذلك حامض يسبب تجمع أشرطة دنا فى كتلة شبكية متداخلة وبعد ذلك يتم عمل طرد مركزى فترسب هذه الكتلة تاركة للبلازميد النقى فى الرائق supernatant. من مزايا هذه الطريقة أيضاً أنه فى بعض الظروف خاصة عند عمل تحلل للخلايا بواسطة SDS ثم المعالجة بواسطة خلاطات



الصوديوم فإن أغلب البروتين و RNA يصبح غير قابل للذوبان ويمكن أيضاً فصله بالطرد المركزي (شكل ٧٦).



شكل ٧٦: تنقية البلازميد بواسطة الدنتره القلوية.

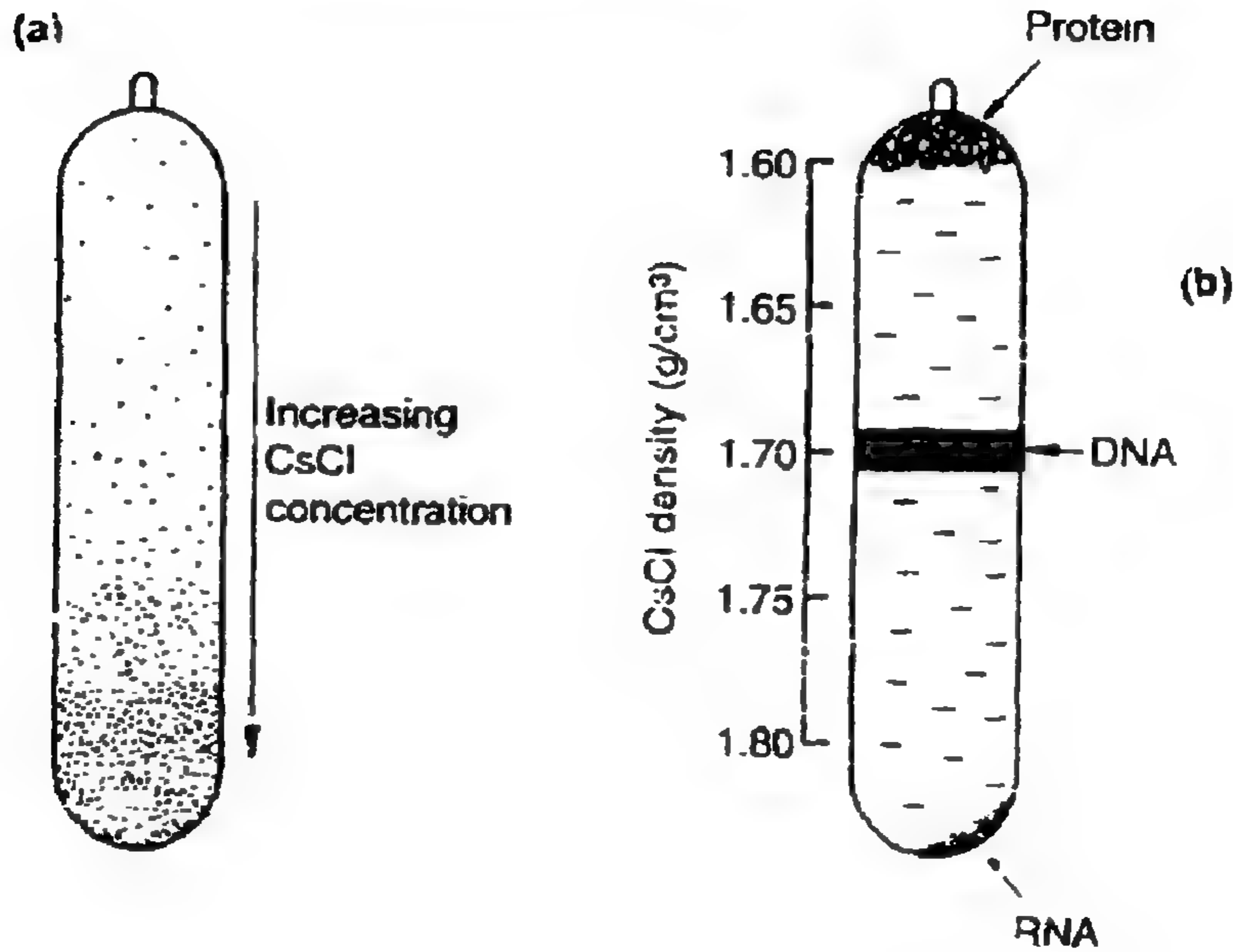
#### ب- الطرد المركزي المتدرج بواسطة بروميد الاثيديوم وكلوريد السيزيوم

#### Ethidium bromide-caesium chloride density gradient centrifugation

يحدث الطرد المركزي المتدرج بواسطة عمل طرد مركزي لمحلول من كلوريد السيزيوم (CsCl) على سرعة عالية جداً. يحدث التدرج لوجود قوة طاردة مركزية عالية تجذب أيونات السيزيوم والكلور في اتجاه قاع الأنبوبة. هجرة هذه الأيونات إلى قاع الأنبوبة يتدخل ويتزن مع حالة الانتشار ولذلك ينشأ تدرج في التركيز حيث أن كثافة كلوريد السيزيوم أكبر في قاع الأنبوبة.

الجزئيات الكبيرة الموجودة في محلول كلوريد السيزيوم عند عمل طرد مركزي لها ستكون حزم عند أماكن معينة من التدرج. يتوقف جزمة جزيء معين على كثافة

الطفو أى العوم buoyant density الخاصة به. كثافة الطفو لدنا حوالى ١,٧ جم/سم<sup>٣</sup> ولذلك فإنها تهجر إلى منطقة فى التدرج فيها كثافة كلوريد السيزيوم أيضاً ١,٧ جم/سم<sup>٣</sup>. على العكس من ذلك فإن جزيئات البروتين لها كثافة طفو أقل ولذلك فإنها تطفو إلى أعلى فى اتجاه قمة الأنبوبة بينما يكون رنا راسب فى القاع (شكل ٧٧). وهكذا فإن الطرد المركزى يمكنه أن يفصل دنا عن رنا والبروتين ويعتبر ذلك بديل لعملية الإستخلاص بالفينول والمعاملة بـ RNase لتنقية دنا.



شكل ٧٧: الطرد المركزى المتدرج بواسطة كلوريد السيزيوم، (أ) تدرج فى تركيز كلوريد السيزيوم بواسطة طرد مركزى فائق السرعة، (ب) فصل البروتين ودنا و رنا فى تدرج كلوريد السيزيوم.

أكثر أهمية من ذلك، الطرد المركزى المتدرج فى وجود بروميد الإيثيديوم (EtBr) يمكن أن يستخدم فى فصل دنا الزائد الحلزونية عن الجزيئات العادية. هذه الجزيئات من بروميد الإيثيديوم يمكن أن تتخلل جزيئات دنا العادية بسهولة وبكمية أكبر حيث تسبب فك نسبي للجزيء وتدخل بين حلزوني دنا مسببة قلة أى خفض فى كثافة الطفو بدرجة كبيرة نسبياً (شكل ٧٨) بدرجة ٠,١٢٥ جم/سم<sup>٣</sup> والعكس صحيح فى

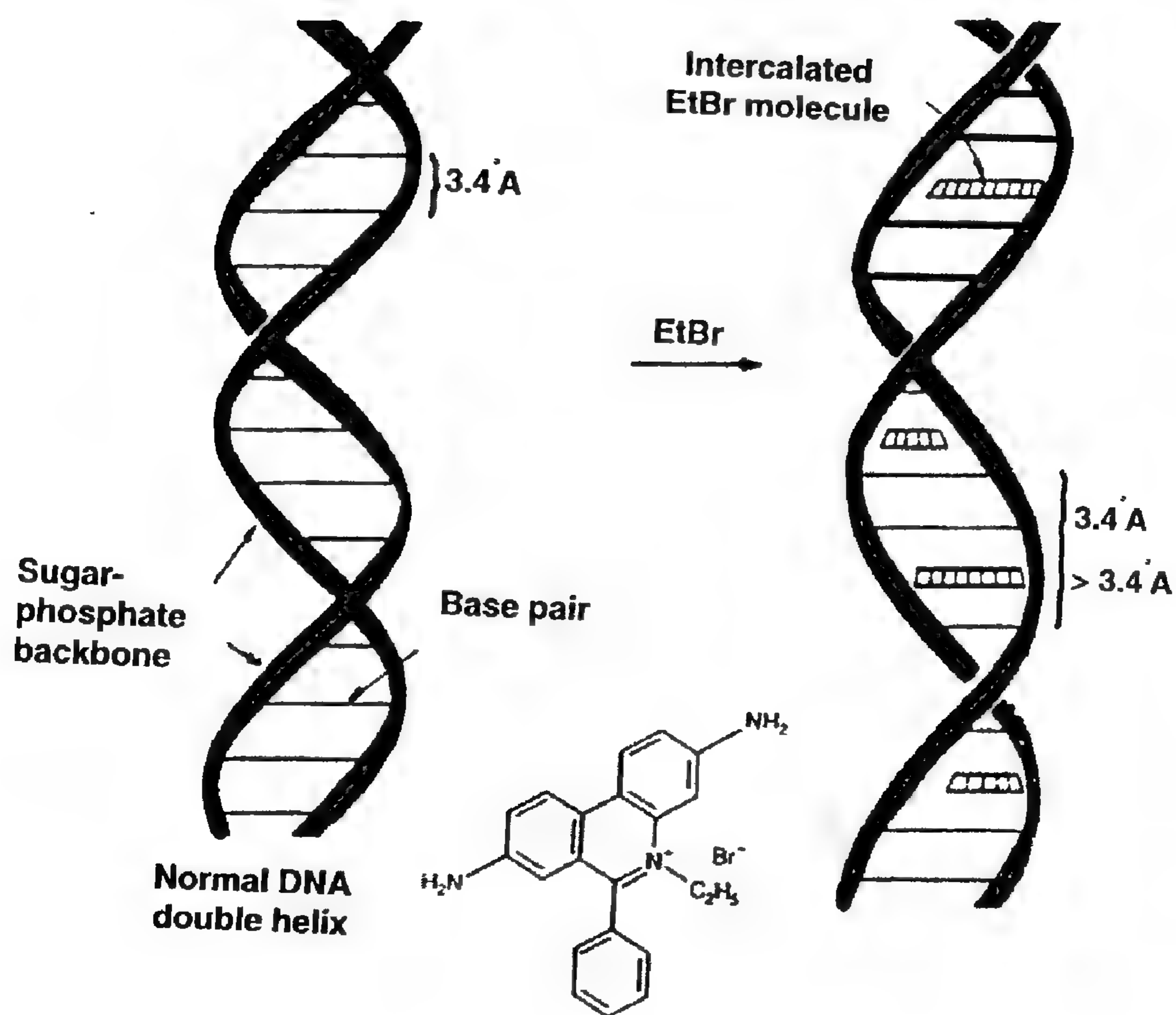
حالة دنا البلازميد حيث أنه لا يمكن فكه بسهولة لأنه زائد الحزنة وليس له أطراف حرة بعكس جزيء دنا العادى الذى له أطراف حرة ولذلك يمكن فكه بسهولة ودخول جزيئات بروميد الإثيديم بتركيز أعلى فى حالة دنا العادى عنه فى حالة البلازميد ولذلك فإن الإنخفاض فى كثافة الطفو يكون قليلاً جداً ٠.٠٨٥ جم/سم<sup>٣</sup> وذلك بالمقارنة بدنا العادى. ولذلك فإن الجزيئات زائدة الحزنة أى البلازميد سوف يكون لها موقع بالأنبوبة يختلف عن مكان دنا العادى أو عن مكان الحلقة المفتوحة. لذلك فإن دنا الشريطى أو ذو الحلقة الفتوحة سيكون أعلى دنا زائد الحزنونية فى الأنبوبة (شكل ٧٩). تعتبر هذه الطريقة زائدة الفاعلية فى فصل البلازميدات حيث سيكون البروتين فى أعلى الأنبوبة يليه دنا العادى يليه دنا زائد الحزنونية يليه فى القاع رنا. مكان حزم دنا يمكن رؤيته بواسطة الأشعة فوق البنفسجية حيث تسبب هذه الأشعة فلورة لجزيئات بروميد الإثيديم المرتبطة بدنا. يمكن سحب البلازميد من الأنبوبة وذلك بواسطة ثقب جانبى وعن طريق حقنة عادية (شكل ٧٩). يتم سحب كلوريد الإثيديم المرتبط بدنا بواسطة البيوتانول n-butanol ثم يتم إزالة كلوريد السيزيوم بواسطة الفرز الإنتشارى (شكل ٧٩). يعتبر تحضير البلازميد الناتج نقى تماماً ١٠٠% ويمكن إستعماله كناقل وسيط للتوطين cloning vehicle.

### زيادة كمية البلازميدات Plasmid amplification:

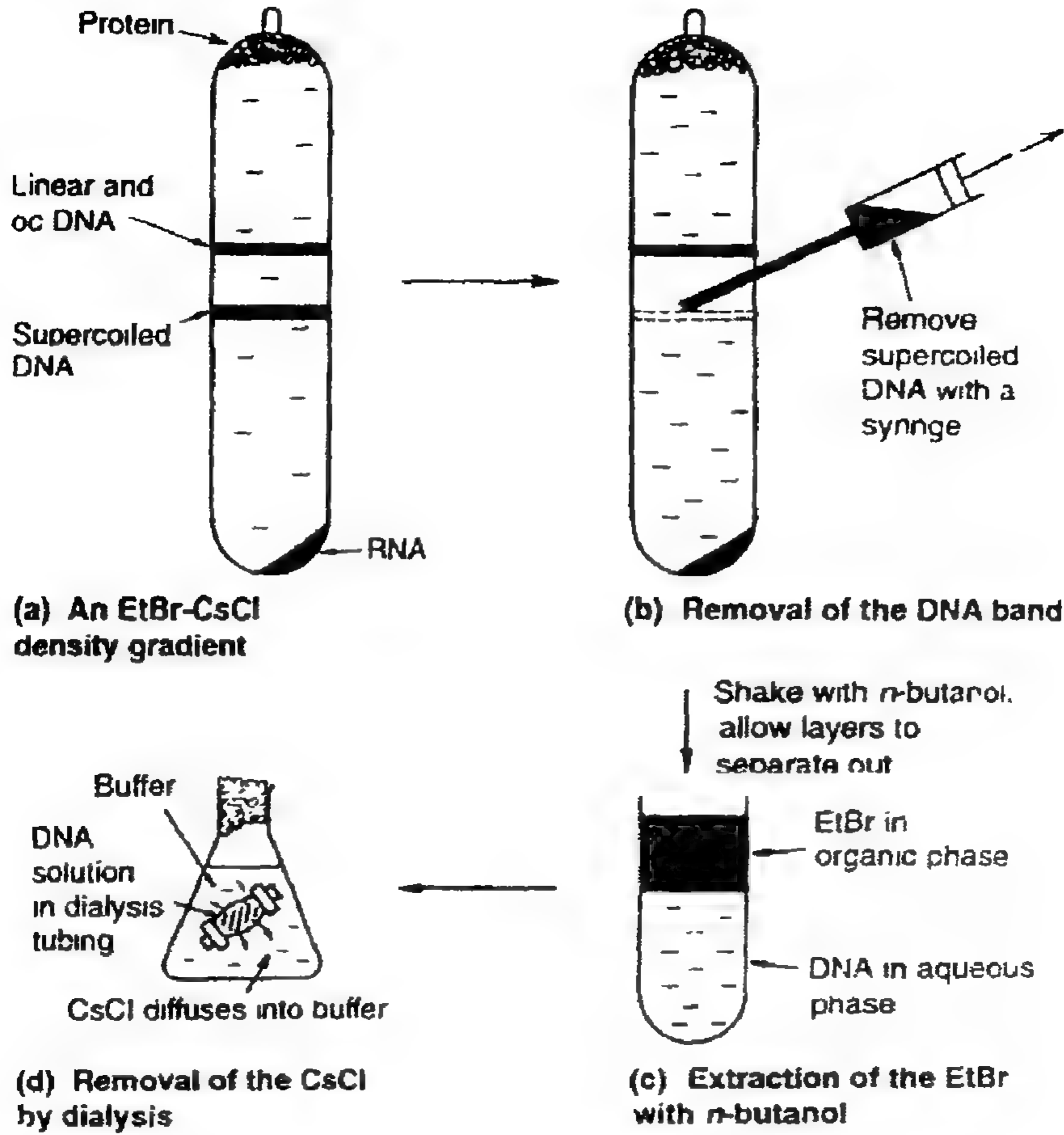
عادة تكون كمية البلازميد بالنسبة لكمية دنا الكلى فى خلايا البكتيريا ضئيلة وهذه الكمية القليلة غير مناسبة لتجارب الهندسة الوراثية. يمكن إستخدام أنواع أخرى من البلازميدات تسمى بلازميدات عديدة النسخ multicopy plasmids حيث يصل عدد البلازميدات فى خلية البكتيريا الواحدة إلى عشرون أو أكثر كما أن لها خاصية مفيدة جداً وهامة جداً أنها يمكن أن تتكاثر فى غياب تخليق البروتين وذلك على العكس تماماً من الكروموسوم البكتيرى الذى لا يمكن أن يتكاثر تماماً فى هذه الظروف. ولذلك بعد نمو البكتيريا على البيئة لدرجة معينة يتم إضافة مثبط لتخليق البروتين



مثل الكلورامفينيكول ثم يتم تحضين المزرعة لمدة ١٢ ساعة. أثناء هذه الفترة يتكاثر البلازميد بسرعة بالرغم من توقف الخلية عن الإنقسام وأيضاً الكروموسوم وبذلك يزداد البلازميدات بدرجة كبيرة في الخلية الواحدة حيث يصل عدد البلازميدات إلى عدة آلاف أو يزيد. وهكذا فإن عملية الزيادة amplification هامة في زيادة عدد البلازميدات في السلالات التي بها عديد من النسخ أي أنها هامة في حالة السلالات عديدة النسخ من البلازميدات.



شكل ٧٨: تركيب بروميد الإيثيديوم. وجزء دنا العادي (شمال) وجزء دنا عادي متداخل معه جزئيات بروميد الإيثيديوم (يمين).



شكل ٧٩: تنقية دنا البلازميد باستخدام طريقة الطرد المركزي المتدرج باستخدام كلوريد السيزيوم وبروميد الإثيديم، (a) فصل المركبات المختلفة بروتين ودنا عادي ودنا بلازميد و RNA، (b) إزالة دنا البلازميد بحقنة عادية من الأنبوبة، (c) إستخلاص بروميد الإثيديم بواسطة البيوتانول، (d) إزالة كلوريد السيزيوم بالفرز الإنتشاري.

### ثالثاً - تحضير دنا الفاج

#### Preparation of Bacteriophage DNA

تعتبر هذه الطريقة أسهل في خطواتها نوعاً ما عما سبق حيث أنه في هذه الحالة لا نحتاج إلى إستخلاص من الخلية حيث أن الفاج يمكن الحصول عليه من خارج الخلية البكتيرية وبسهولة من البيئة السائلة. وعند عمل طرد مركزي للبيئة النامية

عليها البكتيريا ترسب البكتيريا في القاع ويوجد الفاج في الرائق supernatant. ثم يعامل الفاج بخطوة واحدة فقط وهي لنزع بروتين الكابسيد ويصبح دنا الفاج نقى. وفي حالة التجارب العملية يكون من المناسب للفاج لامدا  $\lambda$  يكون  $10^{10}$  لكل مل. ينتج عن  $10^{10}$  جزيء من لامدا 500 ناتوجرام من دنا. تحتاج إلى أحجام كبيرة من المزارع حوالى 500 إلى 1000 مل للحصول على كميات مناسبة من دنا لامدا.

#### **أ- تنمية المزارع للحصول على تركيز عال من الفاج لامدا**

**Growth of cultures to obtain a high  $\lambda$  titre:**

يوجد الفاج  $\lambda$  على هيئة بروفاج prophage مكمل لدنا الخلية البكتيرية ويوجد في حالة lysogen ولذلك يكون التركيز الخارجى من الفاج قليل جداً. ولذلك لابد من عمل عملية induction للبكتيريا لإنتاج الفاج. المقصود بكلمة induction هى عملية دخول البكتيريا إلى مرحلة التحلل لى يحدث تحليل وإنفجار للبكتيريا وموتها وتحرر جزيئات الفاج لامدا في البيئة. من الصعب عمل ذلك ولذلك تستعمل المعامل سلالات حساسة من الفاج لامدا تحمل طفرة حساسة للحرارة تسمى temperature-sensitive mutation (ts) وموقع هذه الطفرة في الجين cI ولذلك لا تحدث حالة التكامل lysogeny إطلاقاً مع دنا البكتيريا ويحدث تحلل لخلايا البكتيريا حيث أنه في عدم وجود الطفرة في هذا الجين يكون الفاج عادى ويلتحم ويكمل دنا البكتيريا lysogen ولذلك لابد من وجود الطفرة في هذا الجين لى يحدث التحلل للبكتيريا يمكن أيضاً إزالة الجين cI تماماً deletion وهكذا تحدث طفرة أيضاً في حالة استخدام الطفرة بالنقص deletion يمكن إنتاج محصول كبير من الفاج لامدا وتحتاج هذه الحالة إلى كفاءة في موعد إضافة الفاج للمستعمرة البكتيرية أى يكون عمر المزرعة مناسب فإذا كانت المزرعة صغيرة السن وعدد الخلايا قليل نسبياً فإن خلايا البكتيريا يحدث لها تحلل سريع بعد إضافة الفاج، ويكون محصول الفاج قليل. إذا كان عمر المزرعة كبير فإن عدد الخلايا يكون كبير وعند إضافة الفاج عدد قليل من الخلايا سيتحل وهكذا يكون محصول الفاج قليل. عندما يكون عمر المزرعة متوسط ومناسب فإنه



بعد إضافة الفاج فإن المزرعة تستمر في النمو لفترة ما ثم يحدث لها تحلل وفي هذه الحالة نحصل على أعلى محصول من الفاج. وهكذا يجب أن يكون هناك موازنة بين حجم لقاح الفاج وعمر مزرعة البكتيريا وعدد خلاياها وأن يكون إضافة حجم اللقاح المناسب في الوقت المناسب وفي هذه الحالة تحتاج إلى كفاءة ومهارة وخبرة الباحث وهكذا يتميز باحث عن آخر.

عن كيفية إتمام عملية الـ induction والتي يمكن أن نعبّر إستحداث تكوين الفاج وموت وتحلل خلية البكتيريا لتحرر جزيئات الفاج في البيئة. يمكن إتمام ذلك بواسطة السلالات المحتوية على طفرة في الجين الحساس للحرارة *cI* حيث أنه في هذه الطفرة في درجة حرارة ٣٠ مئوية تحدث عملية lysogeny عادية يسمى هذا الجين أيضاً *cIts* أى حساس لدرجة الحرارة العالية. ولكن عند نقل المزارع من درجة حرارة ٣٠ مئوية إلى ٤٢ مئوية فإن هذا الجين الطفرة يفقد تحكمه في استمرار حدوث حالة lysogeny وتحدث في درجة ٤٢ مئوية تحرر جزيء الفاج من كروموسوم البكتيريا ويصبح مستقل ويحدث حالة موت وإنفجار الخلية البكتيريا وتحرر الفاج. أى أن هذا الجين المتطفر يتحكم في درجة حرارة ٣٠ مئوية في حدوث حالة lysogeny وقادر على حدوثها ولكن في درجات الحرارة العالية نسبياً ٤٢ مئوية يفقد قدرته في التحكم في حدوث lysogeny ولذلك يحدث للخلية موت وإنفجار وتحرر لجزيئات الفاج لامتداء (شكل ٨٠).

#### ب - جمع الفاج من خلايا البكتيريا المصابة :

##### Collection of phage from an infected culture:

يمكن فصل الفاج من خلايا البكتيريا المحطمة والخلايا السليمة بالطرد المركزي بسرعة عالية حيث ترسب بقايا البكتيريا ويوجد الفاج في الرائق supernatant. تكون المشكلة هنا هو إختصار حجم الرائق إلى ٥ مل أو أقل وهو الحجم المناسب لإستخلاص دنا. يتم ترسيب الفاج بواسطة بولى إيثلين جليكول (PEG) Polyethylene glycol. وهو عبارة عن بوليمر طويل السلسلة يمتص الماء في وجود الأملاح مثل

كلوريد الصوديوم ولذلك تتجمع جزيئات الفاج عليه لتترسب. يمكن جمع الراسب بالطرد المركزي ثم إعادة تعليقه أى نشره فى كمية قليلة من محلول مناسب.

### **ج - تنقية دنا من جزيئات الفاج لامدا**

#### **Purification of DNA from $\lambda$ phage particles**

يمكن تنقية دنا من البروتين وذلك بأى معاملة مناسبة لإزالة البروتين deproteinization من الفاج الناتج من المرحلة السابقة. ولكن عادة فى حالة الفاج لامدا نحتاج إلى خطوة وسيطة قبل ذلك بواسطة طرد مركزى متدرج بواسطة كلوريد السيزيوم وذلك لفصل الفاج عن آثار أو بقايا حطام خلايا البكتيريا، حيث أن راسب PEG عادة ما يحتوى على آثار من حطام الخلايا البكتيرية. سيكون الفاج لامدا فى الأنبوبة بعد الطرد المركزى التدرجى فى الموقع ذو الكثافة بين ١,٤٥ إلى ١,٥٠ جرام/سم<sup>٣</sup>.

يتم سحب الفاج من الأنبوبة بعد ثقبها فى مكان الفاج وسحب الفاج من الثقب بواسطة حقنة عادية. ثم إزالة كلوريد السيزيوم من الجزء المسحوب المحتوى على الفاج بواسطة الفرز الإنتشارى. يصبح تحضير الفاج نقى ومن هذا الفاج يستخلص دنا وذلك بالمعاملة بالفينول أو إنزيم protease لهضم غلاف الفاج البروتينى.

### **د - تنقية دنا الفاج M13**

#### **Purification of M13 DNA**

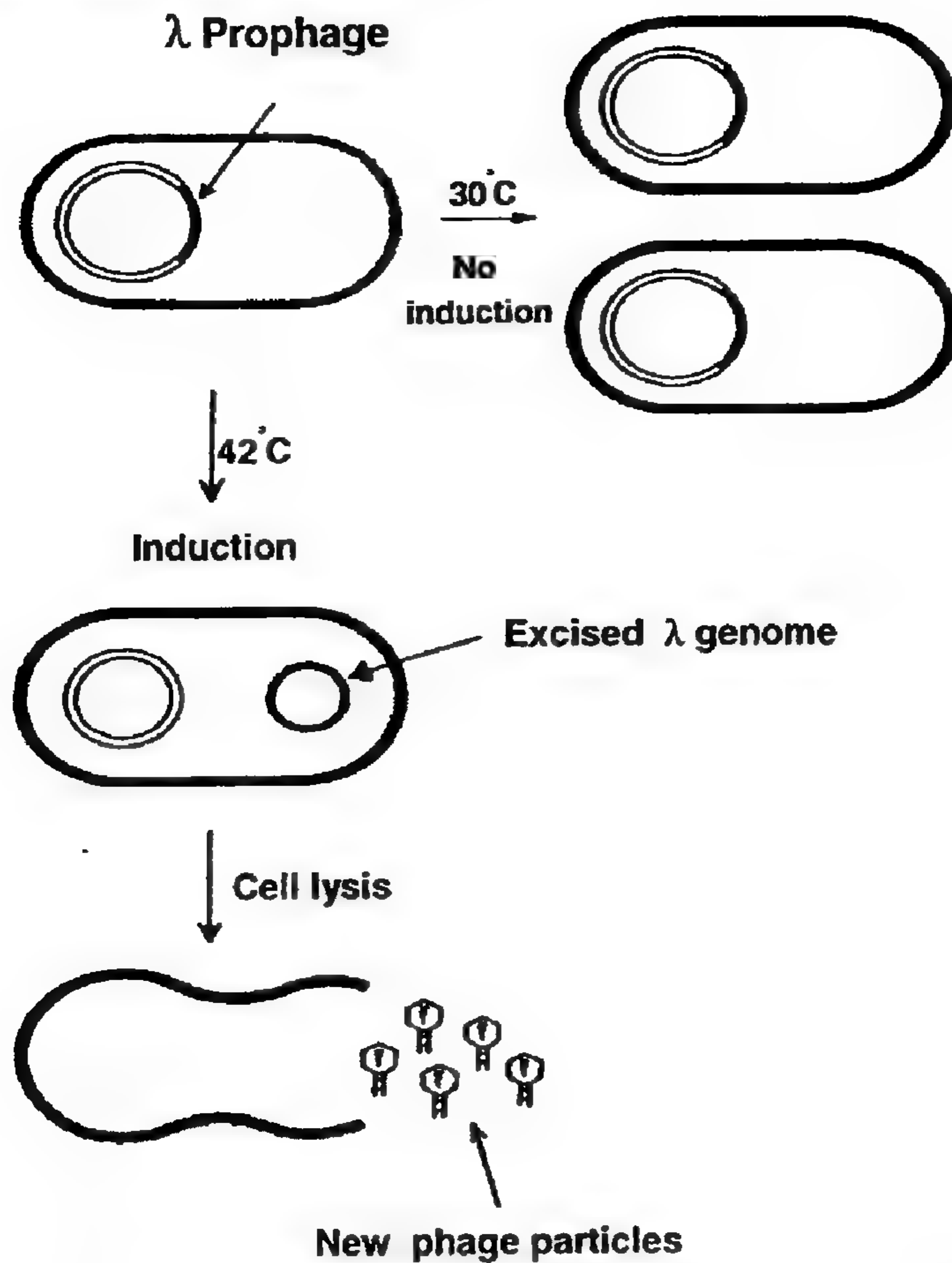
تنقية دنا الفاج M13 ثنائى الحلزون أى الشريطى أى الخيط ds تماثل إلى حد كبير تنقية البلازميدات. حيث يتم تحضير مستخلص خلايا من خلايا البكتيريا المصابة بالفاج M13 ثم فصل الطور التكاثرى للفاج أى ثنائى الخيط dsDNA من دنا البكتيريا بواسطة طريقة الطرد المركزى المتدرج بواسطة كلوريد السيزيوم وبروميد الإثديم.

لفهم هذا الفاج يجب شرح نبذة عنه حيث أن يختلف عن الفاج لامدا تماماً. يعتبر الفاج M13 فاج خيطى الشكل ويختلف فى تركيبه تماماً عن الفاج لامدا. حجم جزيء

دنا في الفاج M13 أصغر كثيراً من حجم جزيء دنا لامدا حيث أن حجم جزيء دنا M13 أى طاقم الوراثة genome عبارة عن طول يتكون من ٦٤,٧ نيوكليوتيدة فقط. هذا الطول يكون على هيئة حلقة أى أن دنا حلقى الشكل ويتكون من جزء دنا وحيد الخيط أى الحلزون ssDNA.

يدل الحجم الصغير لدنا الفاج M13 على أن عدد جيناته أقل من عدد جينات الطاقم الوراثة للفاج لامدا. هذا صحيح حيث أن الغلاف في M13 يتكون من عديد من النسخ لثلاثة بروتينات فقط أى أن يحتاج ثلاثة جينات فقط فى حين أن تخليق رأس وذيل الفاج لامدا يشتمل على ١٥ نوع من البروتينات. بالإضافة إلى ذلك فإن الفاج M13 له نظام لإصابة خلية البكتيريا أبسط بكثير من النظام اللازم للفاج لامدا وأحد الأمثلة على ذلك أن الفاج M13 لا يحتاج إلى جينات لكى يصبح دنا جزء من الطاقم الوراثة لخلية البكتيريا *does not need genes for insertion into the host genome* بينما يحتاج الفاج لامدا ذلك.





شكل ٨٠: عملية induction في حالة وجود طفرة في الجين *cI* وتسمى *cIts* والتي تسبب حدوث lysis في درجة حرارة ٤٢° مئوية ولا تسبب حدوث lysis أى لا يحدث induction في درجة حرارة ٣٠° مئوية.

حقن دنا الفاج M13 فى خلية البكتيريا يحدث عن طريق الهديبات والمفرد هديب pilus (هى زوائد دقيقة توجد على خلية البكتيريا لازمة لعملية التزاوج الجنسي حيث تساعد على ربط الخليتين المتزاوجتين مع بعضهما) ويكون الفاج عبارة عن دنا مفرد الخيط ssDNA وعندما يستقر الفاج داخل البكتيريا فإن الخيط المفرد من دنا يعمل كأصل ويتكون مكمل له خيط مفرد آخر وهكذا يصبح الفاج داخل الخلية البكتيرية ثنائى الخيط dsDNA. هذا الجزيء من دنا لا يلتحم مع الطاقم الوراثى للخلية البكتيرية ولكنه بدلاً من ذلك يتكاثر ليصبح بداخل خلية البكتيريا الواحدة أكثر من مائة نسخة أى أكثر من مائة جزيء. تسمى هذه الجزيئات من دنا ثنائية الخيط dsDNA

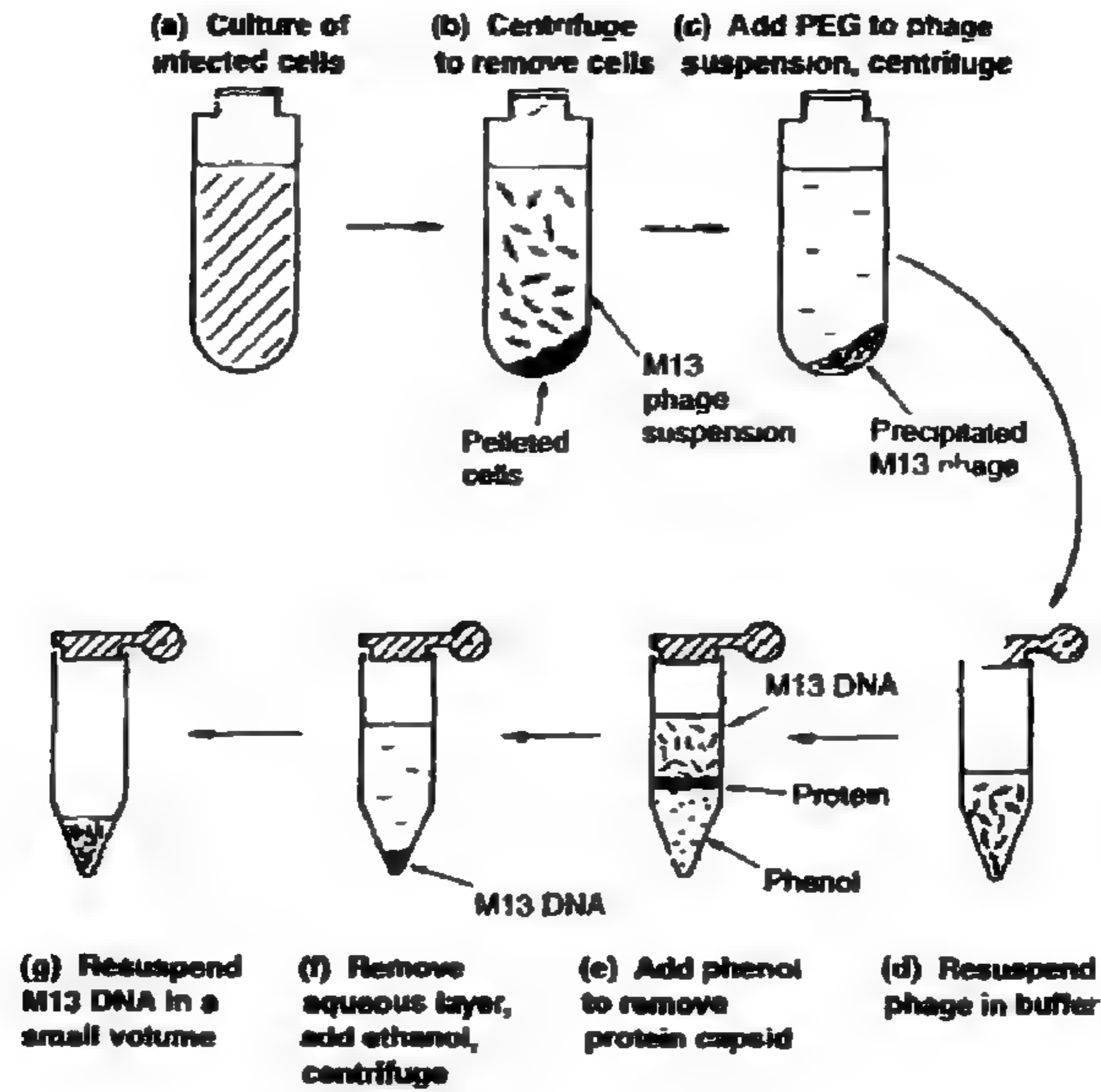
بالأشكال التكاثرية replicative forms وإختصارها RF. وهكذا يحدث التكاثر داخل خلية البكتيريا بهذا الشكل. عند إنقسام الخلية البكتيرية إلى خليتين فإن كل خلية يوجد بها عدد من الطاقم الوراثي للفاج أى عدد من RF والتي تتكاثر لتصل إلى العدد المحدد لها داخل خلية البكتيريا وهو أكثر من مائة جزيء. بعد ذلك عند إنتاج جزيء الفاج المتكامل فى الخلية البكتيرية فغ، دنا الثنائى الخيط يتكاثر بتكوين نظام فك كره وهو ما يسمى rolling circle mechanism حيث ينتج عن ذلك جزيء دنا عادى ولكنه وحيد الخيط ويكون خيطى الشكل فى البداية ssDNA. ثم يحدث له أن يغلق ليكون شكل حلقي circulization ثم يتكون البروتين ويتجمع البروتين مع دنا وحيد الخيط ليكون جزيء فاج M13 متكامل أى ناضج mature phage particle (شكل ١٥١).

لكن الطور الذى يتكون من دنا وحيد الخيط ssDNA أى فة جزيئات الفاج الناضجة الموجودة خارج الخلية البكتيرية فإنه كثيراً ما يكون مطلوب لأبحاث الهندسة الوراثية والوراثة الجزيئية حيث أنه يحتوى على نسخة واحدة من الجينات.

وحيث أن خلايا البكتيريا المصابة دائماً تفرز فى البيئة جزيئات الفاج M13 وحيث أنه لا يحدث انفجار لخلايا البكتيريا إطلاقاً، فإنه تبعاً لذلك يمكن الحصول على تركيز عال من جزيئات الفاج M13 من بيئة البكتيريا المصابة بالفاج. وفى الحقيقة فإنه يمكن الحصول على تركيزات عالية من الفاج وهى ١٠<sup>١٢</sup> جزيء فاج لكل مل من البيئة بسهولة جداً دون الإحتياج إلى طرق خاصة. معنى ذلك أن تركيزات عالية جداً من الفاج ssDNA يمكن الحصول عليها من حجم صغير ٥ مل أو أقل. وأيضاً يلاحظ أن الخلية البكتيرية لا تتحلل ولذلك يصبح معلق الفاج نقي خال من أى بقايا خلايا البكتيريا وهذا بالطبع أكثر تفضيلاً ولذلك نادراً ما نحتاج إلى الخطوة المتبعة مع الفاج لامدا وهى عمل عملية الطرد المركزى المتدرج باستخدام كلوريد السيزيوم.

وبإختصار عملية تنقية هذا الفاج يمكن وصفها فى الحصول على حجم صغير من البيئة السائلة للبكتيريا المصابة ثم عمل عملية طرد مركزى ثم ترسيب جزيئات الفاج

بواسطة PEG ثم طرد مركزي ثم أخذ الراسب وتعليقه في محلول منظم ثم إضافة الفينول لإزالة غلاف الفاج البروتيني ثم الرج سترسب دنا الفاج في قاع الأنبوبة ثم تزال الطبقة السائلة ويبقى دنا راسب في القاع ثم يضاف إيثانول للراسب ثم الطرد المركزي ثم عمل معلق صغير الحجم من دنا الفاج (شكل ٨١).



شكل ٨١: تحضير دنا الفاج M13 من خلايا بكتيرية مصابة من مستعمرات بكتيرية.





الباب السادس

معاملة دنا النقي





## معاملة دنا النقى

### Manipulation of Purified DNA

بعد إستخلاص دنا يتم معاملته معاملات خاصة حيث يتم قطع الجينات المراد نقلها أى فصلها عن دنا الكلى على هيئة أجزاء صغيرة من دنا محتوية على الجين أو الجينات المراد نقلها كما يتم أيضاً عمل قطع فى الناقل الوسيط vector فى موقع أو مواقع خاصة معينة محددة وليست قطع إعتباطى ثم يتم ربط أى لحم أى لصق الجين المراد نقله مع الناقل الوسيط وبذلك يكون الناقل الوسيط جاهز لأداء وظيفته المطلوبة منه. أى باختصار لما سبق قطع جزء cutting مطلوب ثم لصقه أى إلتحام تماماً joining-splicing مع الناقل الوسيط.

جميع الإنزيمات المستعملة فى الهندسة الوراثية والتى سيلي ذكرها تكون موجودة فى كائنات حية وتقوم بدورها ف داخل هذه الكائنات الحية ثم يتم إستخلاص هذه الإنزيمات وتنقيتها وتعبئتها ثم بيعها على نطاق تجارى حيث أن هذه الإنزيمات هى التى تستعمل فى المعمل فى التجارب المعملية البحتة فى الأنابيب وغيرها. حيث أن هذه الإنزيمات تقوم طبيعياً فى الخلية بعمليات تضاعف وتكاثر دنا ونسخ رنا وترجمة دنا وقطع دنا الغريب أو الغير مطلوب مثال ذلك دنا أو رنا الفيروس الغازى للخلية أو تصحيح الأخطاء فى جزيء دنا الناتجة عن الطفرات repair of mutated DNA. ولذلك تقوم بدورها ذلك أيضاً فى المعمل فى أنابيب الإختبار وغيرها *in vitro*.

### إنزيمات معالجة دنا النقى DNA manipulative enzymes

يمكن تصنيف هذه الإنزيمات إلى خمسة مجاميع تبعاً لطريقة عملها إلى ما يأتى:  
١- نيوكلييزات nucleases: وهى إنزيمات لقطع وتقشير الأحماض النووية وتحليلها.

- ٢ - الليجيزات ligases: ربط الأحماض النووية مع بعضها.
- ٣ - البوليميريزات (إنزيمات البلمرة) polymerases: عمل نسخ من الجزيئات سواء أحماض نووية أو غيرها.
- ٤ - إنزيمات محورة modifying enzymes: لإزالة أو إضافة مجاميع كيميائية.
- ٥ - إنزيمات الحلزنة الزائدة topoisomerases: إزالة أو إضافة حلزنة زائدة في دنا حلقي مغلق.

يلاحظ في بعض الإنزيمات أنه يمكن أن يقوم الإنزيم بأكثر من وظيفة حيث أن عدد من البوليميريزات تقوم ببناء جزيئات دنا وفي نفس الوقت تقوم بهدم هذه الجزيئات أي تحليلها. يلاحظ أيضاً أنه توجد إنزيمات مماثلة تعمل على رنا ومنها إنزيمات ريبونوكلييزات RNase.

## النيوكلييزات Nucleases

تحلل النيوكلييزات جزيئات دنا وذلك بتكسير الرابطة الثنائية الإسترالفوسفورية phosphor diester bond والتي ترتبط نيوكليوتيد بالذي يليه في شريط دنا أي جزيء دنا. ويوجد نوعين من النيوكلييزات وهما:

- ١ - النيوكلييز الخارجى exonuclease: يزيل النيوكليوتيدات مبتدئاً من طرف الجزيء.
- ٢ - النيوكلييز الداخلى endonuclease: يزيل النيوكليوتيدات مبتدئاً من داخل الجزيء. وليست من الأطراف.

يمكن تصنيف إنزيمات النيوكلييزات الخارجية على أساس عدد الأشرطة التي تهاجمها أي تحللها عندما يهاجم (يحلل) الإنزيم جزيء ثنائي الحلزون. مثال ذلك إنزيم يسمى Ba 131 يتم تنقيته من البكتيريا *Alteromonas espejiana* ويحلل كلا الحلزونين أي الشريطين من كلا الطرفين والعكس صحيح في حالة إنزيم

III exonuclease الخاص بالبكتيريا إ. كولاى حيث يهاجم أى يحلل الإنزيم أحد الشريطين دون الشريط الآخر من أحد الطرفين حيث أنه يهاجم النهاية 3' ولا يهاجم النهاية 5' ولذلك يمكن أن ينتج عن ذلك جزيء أحادى الحلزون أى الشريط ssDNA.

تنطبق نفس القاعدة على إنزيمات النيوكلييزات الداخلية مثل إنزيم النيوكلييز الداخلى (S1 endonuclease) S1 والمستخلص من الفطر *Aspergillus oryzae* سوف يحلل فقط حلزون واحد أى يحلل ssDNA فقط وفى حالة وجود nick فى أحد الحلزونين فإنه يقوم بكسر الحلزون المقابل لهذا القطع. وفى حالة الإنزيم DNase 1 (1 deoxyribanuclease) والمستخلص من بنكرياس الأبقار يقطع كلا من الحلزون الأحادى والحلزون الثنائى أى يقطع ssDNA، dsDNA. يعتبر الإنزيم الأخير غير متخصص من حيث أنه يكسر الجزيء من أى مكان داخله ونتيجة لذلك يتكون خليط من وحدات النيوكليوتيدات mononucleotides، وقليلة النيوكليوتيدات القصيرة جداً very short oligonucleotides والعكس صحيح عما سبق حيث أنه توجد إنزيمات تسمى restriction endonucleases وهى تحلل أى تكسر دنا ثنائى الحلزون أى ثنائى الخيط dsDNA أى تفصله إلى أجزاء عديدة. أى يكون القطع فى كلا الحلزونين. لابد أن يكون القطع فى أماكن محددة at a limited number of specific recognition sites وسوف يتم شرح هذه الإنزيمات بالتفصيل فيما بعد.

### الليجيزات Ligases

إنزيم دنا ليجيز DNA ligase لإصلاح وربط ولصق الكسر فى الشريط المفرد أى الحلزون المفرد والتى تنشأ مثلاً أثناء تضاعف وتكرار دنا. دنا ليجيز فى أغلب الكائنات يمكن أيضاً أن يلحم حلزونين لجزيء دنا أى لا يكون لصق مفرد بل لصق مزدوج. وسوف يتم شرح هذا الإنزيم عند شرح دور هذه الإنزيمات فى تكوين دنا المعاد صياغته recombinant DNA molecules.



## البوليميريزات Polymerases

دنا بوليميريز عبارة عن إنزيمات تخلق حلزون جديد أى خيط جديد من دنا تكميلي complementary لدنا موجود فعلاً أو جزيء موجود فعلاً template. أغلب البوليميريزات تعمل فقط عند وجود أصل template له منطقة أى جزء ثنائى الحلزون والتي تعمل كبداية أى البادئ primer وذلك أن البداية أى البادئ لازم لعملية التخليق أى البلمرة (شكل ٨٢).

توجد ثلاثة أنواع من دنا بوليميريز تستخدم روتينياً فى الهندسة الوراثية وهى:

### ١ - إنزيم DNA polymerase I:

والذى يتم تحضيره من إ.كولاي عادة. هذا الإنزيم يلتصق بمنطقة قصيرة ضيقة وحيدة الحلزون (أى يتصل بقطع nick) فى جزيء دنا ثنائى الحلزون وينتج عن نشاطه جزيء دنا ثنائى الحلزون أى يحدث تكملة وبناء فى المنطقة القصيرة الفارغة gap. وفى هذه الأثناء يحلل الحلزون الموجود فعلاً بداية من منطقة الفجوة أى القطع وأيضاً يبني حلزون جديد مكانه. أى أن الحلزون المجاور للقطع قد تم تحليله وبناءه مرة أخرى من جديد. ولذلك يعتبر هذا الإنزيم له نشاط مزدوج dual activity وهو هدم دنا وبلمرة دنا فى نفس الوقت أى DNA polymerization and DNA degradation.

وفى الحقيقة فإن النشاط المزدوج لإنزيم polymerase I حيث أن له نشاط nuclease ونشاط polymerase (شكل ٨٢) وهذين النشاطين يتم التحكم فيهما بواسطة أجزاء خاصة من الإنزيم. نشاط nuclease موجود فى ٣٢٣ حامض أمينى الأوائل أى فى المقدمة من سلسلة عديد الببتيد ولذلك فإن إزالة هذا الجزء ينتج عنه إنزيم محور والذى يكون له نشاط بوليميريز فقط وغير قادر على القيام بهدم دنا أى ليس له نشاط nuclease. يعتبر الأخير إنزيم محور modified enzyme يسمى شظية كليناو أو كسرة كليناو Klenow fragment.



٢ - إنزيم شظية كليناو أو كسرة كليناو Klenow fragment:

تخليق دنا تكميلي cDNA أى complementary DNA على أصل وحيد الحزون أى حزون أى خيط مفرد single-stranded template. وحيث أن هذا الإنزيم ليس له نشاط إنزيم نيوكلييز فإنه يكون غير قادر على النشاط بعد ملء الفجوة أو القطع gap or nick حيث أنه لا يحل بقية الحزون. أى أن هذا الإنزيم يملأ الفجوة أو القطع فقط فى أحد حزونى دنا. أما الأجزاء بعد الفجوة فتبقى كما هى ولا تغيير ولا تحليل فيها بعكس الإنزيم السابق الذى يهدمها أى يحللها ثم يبينها (شكل ٨٢). توجد إنزيمات عديدة من البوليميريزات من هذا النوع منها الطبيعى natural ومنها الصناعى المحور modified أى modified version. يعتبر إنزيم شظية كليناو من النوع الثانى. ولهذا الإنزيم أهمية كبيرة فى عمل عملية تتابع دنا DNA sequencing.

٣ - إنزيم النسخ العكسى Reverse transcriptase:

وهو المسئول عن تكاثر وتكرارية عديد من أنواع الفيروسات. وهذا الإنزيم فريد فى أنه يستخدم الأصل رنا كأصل RNA template لإنتاج دنا (شكل ٨٢) هذا الإنزيم هام فى الهندسة الوراثية. وهذا الإنزيم ونشاطه هام جداً وكأساس لعملية توطين دنا التكميلي وهى بالإنجليزية cDNA cloning.

## الإنزيمات المحورة لدنا

### DNA Modifying Enzymes

توجد إنزيمات عديدة من هذا النوع تحور من تركيب دنا وذلك بإضافة أو إزالة مجاميع معينة وأهمها ما يأتى:

١ - الفوسفاتيز القلوى Alkaline phosphatase:

يتم إستخراجه من إ. كولاى أو الأنسجة المعوية للبقر والذى يقوم بإزالة مجموعة الفوسفات الطرفية الموجودة فى الطرف 5' لجزيء 5' terminus.

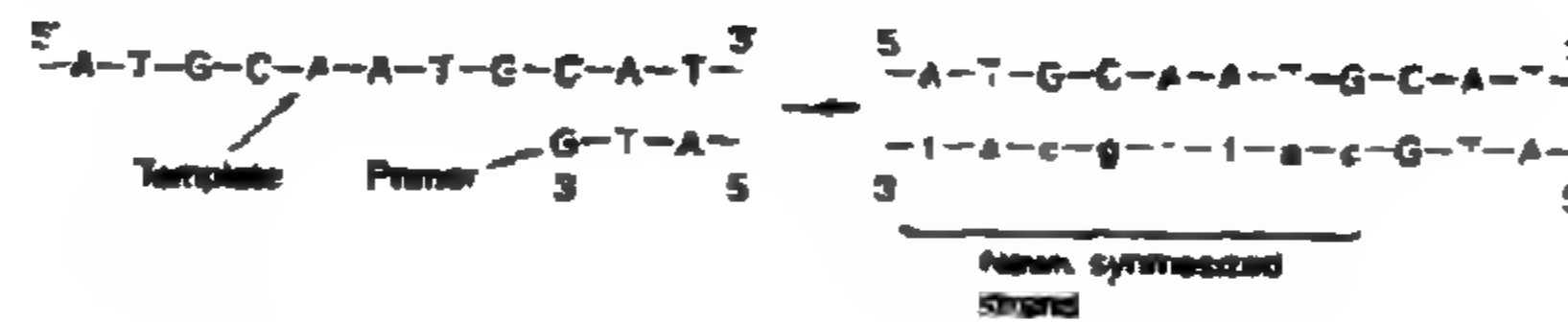
## ٢ - Polynucleotide kinase:

يستخلص من البكتيريا إ. كولاى المصابة بالفاج T4. وهذا الإنزيم بعكس الإنزيم السابق حيث أنه يضيف مجموعة فوسفات للنهاية الحرة 5' أى الطرف 5'.

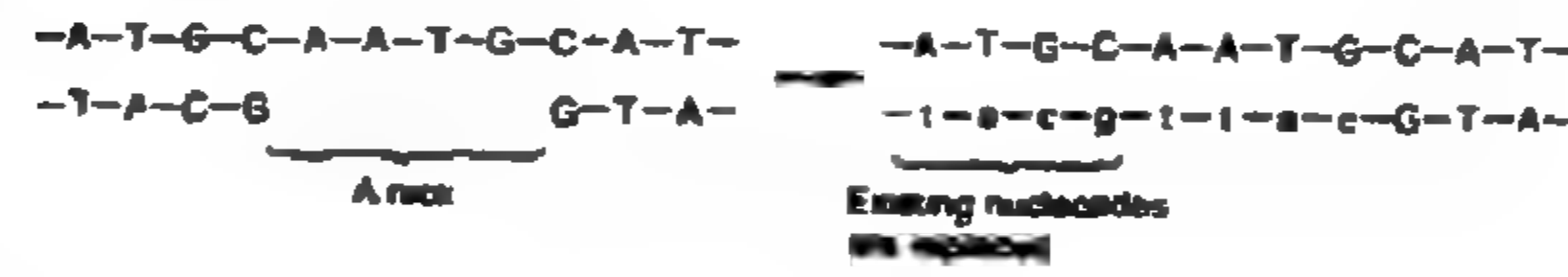
## ٣ - Terminal deoxynucleotidyl transferase:

يستخلص من نسيج thymus البقر (thymus) عبارة عن غدة عديمة القنوات توجد فى الرقبة فى الفقاريات والإنسان بالطبع وتسمى بالغدة التيموسية أو الصغترية. وهى عادة تصبح أثرية فى الإنسان الناضج أى تصبح أثرية بتقدم السن) ويضيف هذا الإنزيم جزيء أو أكثر من deoxynucleotides على الطرف 3' لجزيء دنا.

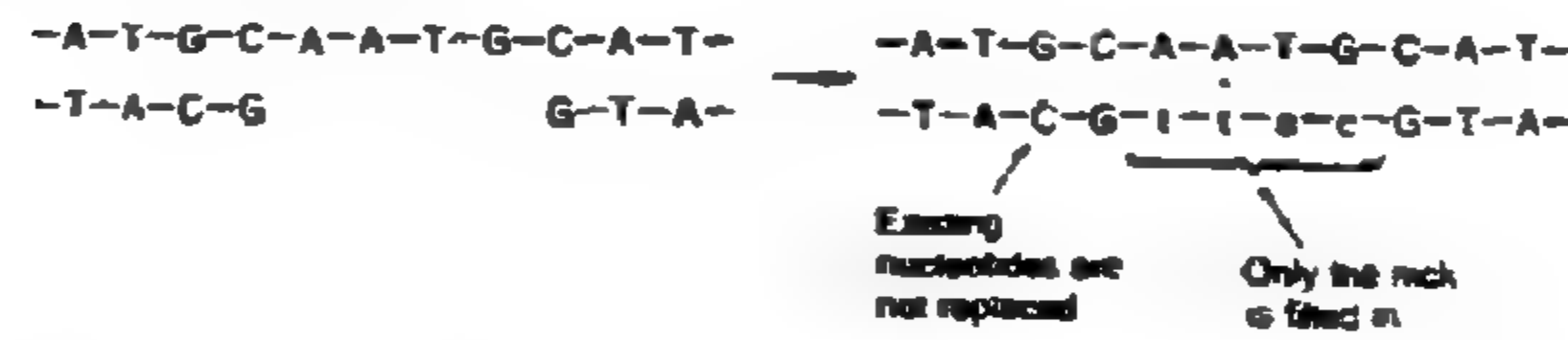
(a) The basic reaction



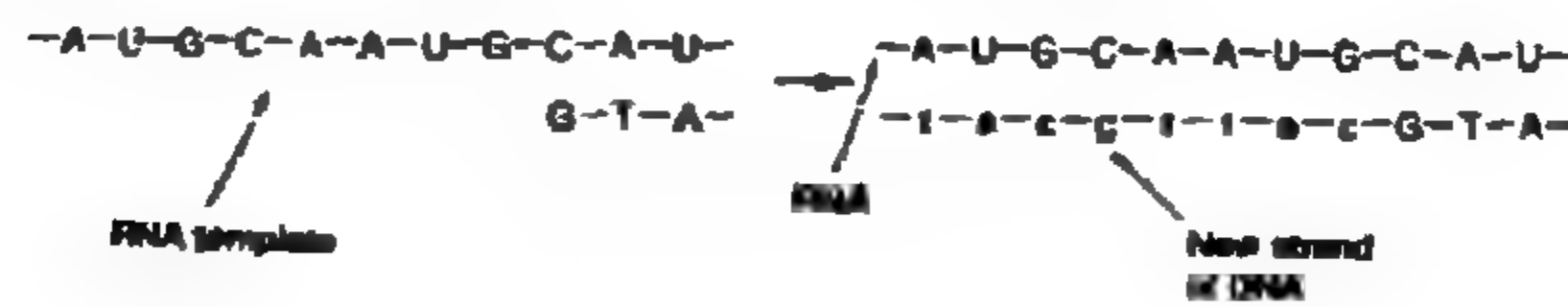
(b) DNA polymerase I



(c) The Klenow fragment



(d) Reverse transcriptase



شكل ٨٢: تفاعلات وأنشطة إنزيمات البوليميرازات، (أ) شريط دنا مخلق من جديد فى الاتجاه من 5' إلى 3'، (ب) نشاط بوليميراز 1 والذى يملأ الفجوة ثم يحلل ويعيد بناء الجزء التالى للفجوة، (ج) نشاط إنزيم شظية كلينار والذى يملأ الفجوة فقط دون تحليل وإعادة بناء، (د) نشاط إنزيم النسخ العكسي والذى يستعمل رنا كأصل لبناء جزيء دنا.

## الإنزيمات الحلزنة الزائدة

### Topoisomerases

وهي إنزيمات تزيد أو تقلل الحلزنة الزائدة لجزيء دنا الحلقي أى المغلق والذي يسمى الحلقي المغلق التعاوني covalently closed-circular DNA ومثال لذلك جزيئات البلازميدات حيث تؤثر عليها هذه الإنزيمات بشدة من حيث زيادة أو تقليل الحلزنة الزائدة supercoiling. لها دور هام فى دراسة تكرارية أى تكاثر جزيء دنا ولكن ليس لها دور جوهري فى الهندسة الوراثية حتى الآن.

## إنزيمات قطع دنا الداخلية المشروطة (المحددة)

### Restriction Endonucleases

تحتاج عملية توطين الجين هذه الإنزيمات وهى أساسية فى ذلك حيث أنها أولاً لازمة لقطع الجين المطلوب وفصله عن جزيء دنا الكبير الحجم وبذلك يسهل إدخال الجين المطلوب إلى الناقل الوسيط، لا يمكن إدخال جزيء كبير للناقل الوسيط، ومثال ذلك أنه يمكن أن يكون الجين المطلوب ٢-٣ كيلو قاعدة kb ومطلوب قطعه وفصله من جزيء كبير ٨٠ كيلو قاعدة kb. ثانياً أن هذه الإنزيمات لازمة لقطع جزيئات دنا الكبيرة الحجم إلى جزيئات صغيرة الحكم ليمنح حملها بواسطة الناقل الوسيط كما أنها لازمة لقطع الناقل الوسيط الحلقي مثل البلازميد فى مكان واحد فقط وهذا المكان محدد ومتماثل فى البلازميدات، حيث أنه لابد أن يكون مكان محدد بذاته، إذا تم قطع جزيء الناقل الوسيط إلى أجزاء عديدة نتيجة للقطع فى أكثر من مكان فإن هذا الناقل لا يصلح إطلاقاً لتوطين الجين. الناقل الوسيط يكون به قطع ذو مسافة معينة لإدخال جين معين ومثال ذلك أن الناقل الوسيط M13 يكون غير فعال فى حالة وجود جزيء دنا أكبر من ٣ كيلو قاعدة kb إذ يكون لكل ناقل وسيط معين كفاءة معينة فى نقل جين معين ذو حجم معين. تم إكتشاف الفائدة العظيمة لهذه الإنزيمات فى توطين



الجين بواسطة علماء W. Arber و H. Smith و D. Nathans وقد نالوا عليها جائزة نوبل عام ١٩٧٨.

### **كيفية إكتشف هذه الإنزيمات:**

أول ملاحظة عن ذلك كانت في بداية الخمسينيات حيث وجد أن بعض سلالات البكتيريا تكون منيعة أى لا تصاب إطلاقاً بالقاج وتسمى هذه الظاهرة *host-controlled restriction* وقد إستغرق تحليل هذه الظاهرة حوالى عشرون عاماً أو يزيد. حيث أن هذه الإنزيمات توجد فى البكتيريا والتي تسبب تحليل دنا الفاج قبل تكراره أى قبل تخليق جزيئات فاج جديدة. يكون دنا خلية البكتيريا نفسه منيع ضد هذا الإنزيم لأنه يحتوى على مجاميع ميثيل إضافية تمنع عمل هذه الإنزيمات، وبذلك تبقى دنا الخاص بها من التحليل. يتم تخليق هذه الإنزيمات فى جميع البكتيريا أو أغلبها وقد أمكن التعرف على أكثر من ١٢٠٠ نوع من هذه الإنزيمات. يمكن تصنيف هذه الإنزيمات إلى ثلاثة مجاميع أو طرز تبعاً إلى طريقة أو آلية أداء عملها *mode of action*، وهذه الطرز هى طراز I وطراز II وطراز III. الطرازين I، III معقدين جداً ولهما إستعمال محدود فى الهندسة الوراثية. ولكن الطراز II يشمل هذه الإنزيمات والتي تستخدم فى الهندسة الوراثية بكثرة وأيضاً فى توطين الجين.

### **إنزيمات الطراز II وهى التى تقطع دنا فى تتابع معين:**

Type II restriction endonucleases cut DNA at specific nucleotide sequence:

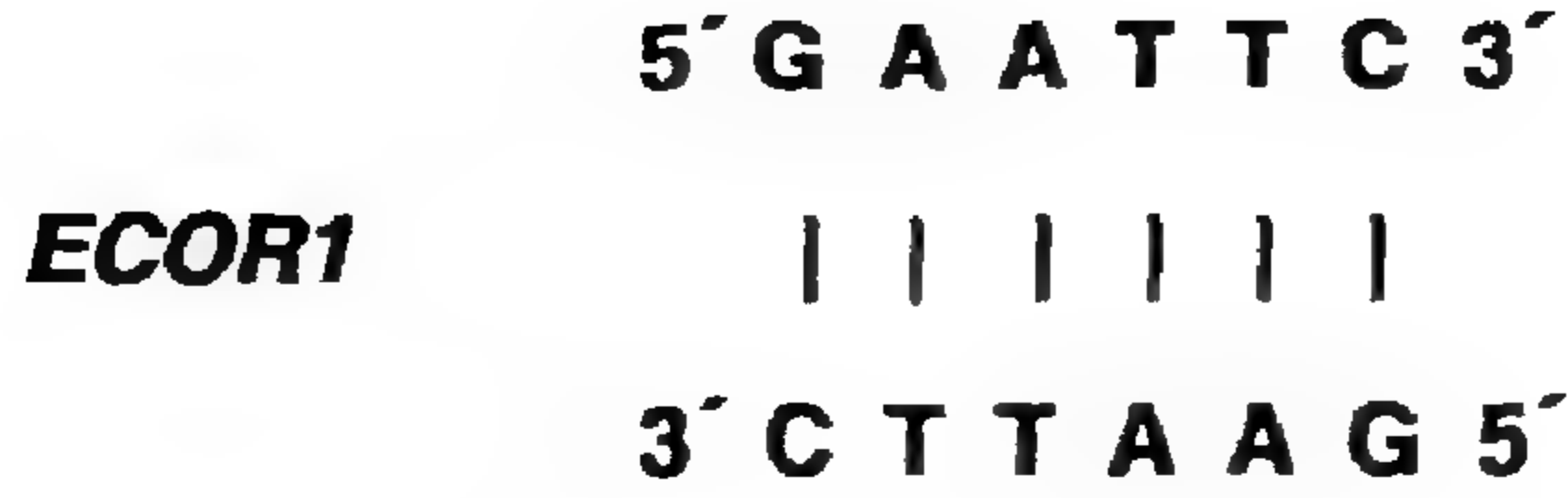
صفة أساسية لهذه الإنزيمات أن كل إنزيم له تتابع قواعد معينة عنده يقطع جزيء دنا (عند الحديث عن هذه الإنزيمات سنسميها إنزيمات القطع المشروطة فقط ولكن ليعلم القارئ أنها تتبع الطراز II ولن نذكر ذلك فى كل مرة للإختصار). مثال ذلك أن *PvuI* المعزول من البكتيريا *Proteus vulgaris* يقطع دنا فقط عند التتابع لستة قواعد نيوكليوتيدات أى يكون التتابع محدد لستة قواعد معينة نيوكليوتيدات



وهي C ثم G ثم A ثم T ثم C ثم G إلى CGATCG. والعكس صحيح في حالة إنزيم آخر مستخلص من نفس البكتيريا يسمى *PvuII* يقطع تتابع آخر مختلف لستة قواعد نيوكليوتيد وهو C ثم A ثم G ثم C ثم T ثم G أي التتابع CAGCTG. كثير من هذه الإنزيمات تتعرف على تتابع مكون من ستة نيوكليوتيدات كما سبق شرحه ولكن البعض الآخر يتعرف على تتابع قواعد مكون من 4 قواعد أي 4 نيوكليوتيدات والبعض الآخر يتعرف على تتابع مكون من 5 نيوكليوتيدات والبعض الآخر يتعرف على تتابع مكون من 8 نيوكليوتيدات وهكذا. إنزيمات إستخرجت من البكتيريا *Staphylococcus aureus* السلالة رقم 3 A ويسمى الإنزيم *Sau 3A* يتعرف على تتابع أربعة نيوكليوتيدات GATC أي G ثم A ثم T ثم C.

إنزيم آخر يسمى *Alu I* يستخرج من البكتيريا *Arthrobacter luteus* والذي يقطع تتابع أربعة نيوكليوتيدات وهي AGCT أي A ثم G ثم C ثم T. توجد أمثلة أخرى لإنزيمات أقل في حساسيتها للتعرف على تتابع معين أي أنها أقل حساسية في التعرف على تتابع القواعد وتسمى هذه الإنزيمات بالإنجليزية *degenerate recognition sequences* حيث أنها تتعرف على عائلة من تتابع القواعد المتشابهة *family of related sites* أي نفس العدد من القواعد ولكن في تباديل وتوافيق في ترتيب هذه القواعد ومثال ذلك الإنزيمات المسماة *Hinfi* المستخرجة من البكتيريا *Haemophilus influenza Rf* السلالة Rf وهي تتعرف على عديد من تتابع القواعد وهي GATC، GAGTC، GACTC، GAATC، GANTC.

وفيما يلي جدول لبعض هذه التتابعات من القواعد والتي تقطعها بعض الإنزيمات المشهورة والمستعملة بكثرة في توطين الجين والهندسة الوراثية (جدول 5) تتابع القواعد يكون ترتيبه في الإتجاه 5' إلى 3' في خيط أو حلزون واحد أي أول حرف من الشمال في التتابع يكون ناحية الطرف 5' وآخر حرف في اليمين يكون ناحية الطرف 3'. لاحظ أن الحلزون الثاني يكون مكمل له تماماً ويكون في الإتجاه العكسي 3' إلى 5' كما في الشكل (شكل ٨٣).



شكل ٨٣: يوضح ترتيب القواعد في حلزون مفرد (العلوي) ويكون من 5' إلى 3' وعكسه أي الحلزون الثاني المكمل (السفلي) يكون ترتيب القواعد معكوس تماماً ويكون في الاتجاه 5' إلى 3' وذلك توضح القواعد عمل إنزيم *EcoRI*.

جدول ٨٥: تتابع القواعد لبعض إنزيمات القطع الداخلية المشروطة (r.e) المستعملة بكثرة (التابع المكتوب في الجدول من الاتجاه 5' إلى 3').

Enzyme	Organism	Recognition Sequence	Blunt or Sticky end
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	Sticky
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloiquefaciens</i>	GGATCC	Sticky
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT	Sticky
<i>PvuI</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	Sticky
<i>OvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	blunt
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	AAGCTT	Sticky
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rf	GANTC	Sticky
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	GATC	Sticky
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	blunt
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA	Sticky
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC	blunt
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GCGGCCGC	Sticky

النهايات المستوية والنهايات اللزجة: Blunt and sticky ends

بعض إنزيمات القطع الداخلية المشروطة (r.e) تحدث قطع بسيط في حلزوني دنا في منطقة واحدة يكون القطع في منطقة في منتصف تتابع القواعد. يكون القطع في كلا الحلزونين على إستقامة واحدة أي كخط مستقيم وتسمى الأطراف الناتجة

بالأطراف المستوية blunt end أو flush end ومن أمثلة ذلك الإنزيمات *Alu I*. *Pvu II*. ولكن يوجد عدد كبير من إنزيمات القطع الداخلية المشروطة (r.e) تقطع حلزوني دنا في منطقتين مختلفتين داخل تتابع القواعد الخاصة بالإنزيم أى القطع لا يكون على إستقامة واحدة فى كلا حلزوني دنا أى يقطع أحد حلزوني دنا فى منطقة ويقطع الحلزون الآخر فى منطقة معينة بعيدة عن قطع الحلزون الأول وفى داخل تتابع القواعد الخاص بالإنزيم ولذلك تكون نهاية القطع غير مستوية بل مشرشرة لمسافة إثنين إلى أربعة قواعد أو نيوكليوتيدات عادة وتسمى الأطراف فى هذه الحالة بالأطراف اللزجة sticky or cohesive ends سميت كذلك لأنها عند تقاربها من بعضها تلتصق ببعضها بسهولة مرة أخرى وتصبح سليمة كأن شئ لم يكن. حيث تتقابل القواعد المفردة المتوافقة وجهاً لوجه ويحدث الارتباط بينهما مرة أخرى.

أحد الصفات الهامة فى ذلك أن إنزيمات القطع الداخلية المشروطة المختلفة يمكن أن ينتج عن أكثر من واحد من هذه الإنزيمات نفس الطرف اللزج ومثال ذلك أن الإنزيم *Bam HI* يكون التتابع الخاص به CGATCC والإنزيم *Bgl II* يكون التتابع الخاص به AGATCT وكلاهما ينتج الطرف اللزج GATC أى نفس الطرف اللزج. علاوة على ذلك وجد أن الإنزيم *Sau 3A* يتعرف على تتابع القواعد الرباعى GATC (tetranucleotide) والذي يقطعها من الطرفين أحد القطعين فى أحد الحلزونين قبل G والقطع الآخر فى الحلزون الآخر قبل G أيضاً وهكذا يكون الطرف اللزج هو GATC فى كلا الحلزونين.

مما سبق يتضح أن GATC نتجت من نشاط ثلاثة إنزيمات مختلفة، ومما هو جدير بالذكر أن هذه الأطراف اللزجة الناتجة من الإنزيمات المختلفة يمكن أن تلتحم مع بعضها عند خلطها مع بعضها لأنها مكملة لبعضها، وحيث تلتحم الأطراف اللزجة مع بعضها، دون تمييز لترتيب دنا الأصيلى والذي يختلف فى التركيب ولذلك تعمل عليه إنزيمات مختلفة، ولكن الأطراف اللزجة متوافقة فى الحالات الثلاثة السابقة وتلتحم مع بعضها عند خلطها.



## تكرارية تتابع القواعد المعينة (ذات الترتيب المعين) فى جزيء دنا

## The frequency of recognition sequences in a DNA molecule

عدد تكرارية تتابع القواعد المعينة recognition sequences التى يتعرف عليها إنزيم القطع الداخلى المشروط فى جزيء دنا معروف الطول يمكن حسابها ولو نظرياً.

أولاً وبادئ ذى بدء إفتراض أن القواعد أى النيوكليوتيدات موزعة بطريقة عشوائية وأن الأربعة قواعد المختلفة موجودة بنسب متساوية. ولذلك فإن تتابع أربعة قواعد وهى مثلاً GATC لابد أن تحدث مرة فقط كل  $4^1 = 256$  نيوكليوتيدة وتتابع ستة قواعد مثلاً GGATCC تكون مرة فقط كل  $4^6 = 4096$  نيوكليوتيدة وهكذا إذا كان خمسة قواعد يكون مرة فقط كل  $4^5$  نيوكليوتيدة وهكذا مرة كل  $4^3$  أو  $4^2$  وهكذا. عملياً لا تكون هذه الإفتراضات صحيحة تماماً. مثال ذلك أن دنا فى الفاج لامدا وله حوالى 49 كيلو قاعدة (kb) لابد وأن يحتوى على حوالى 12 موقع قطع لإنزيم القطع الداخلى المشروط والذي له تتابع قواعد مكون من ستة قواعد أى ستة نيوكليوتيدات. ولكن فى الحقيقة أن مواقع القطع والتعرف أقل من 12 موقع. ومثال ذلك إستخدمنا تتابع قواعد معينة للقطع عدد القواعد فيها ستة وذلك بالنسبة لإنزيمات *Sal I*، *Bam HI*، *Bgl II* حيث أنها تعمل على قواعد عدده ستة. المفروض يوجد 12 موقع قطع لكل إنزيم ولكن فى الطبيعة وعملياً وجد أن مواقع القطع أقل بكثير فهى ستة مواقع قطع لإنزيم *Bgl II* وخمس مواقع قطع لإنزيم *Bam HI* وموقعين للقطع فقط فى حالة *Sal I*. وهذا يفسر بأن نسب القواعد بعضها إلى البعض غير متساوية فى حالة دنا الفاج لامدا حيث من المفروض أن يكون محتوى دنا للفاج من القاعدتين GC يساوى 50% ولكن النتائج العملية توضح أن محتوى دنا للفاج من القاعدتين GC أقل من 50%.

أكثر من ذلك أن هضم دنا الفاج لامدا بكل من الإنزيمات الثلاثة السابق ذكرها المفروض أنه يعطى أجزاء أى شظايا تقريباً متساوية فى حجمها، كل إنزيم يعطى



أجزاء متساوية في حجمها نتيجة الهضم. ولكن العكس صحيح عملياً (شكل ٨٤) حيث وجد أن ناتج كل إنزيم أعطى أجزاءً أي شظايا من دنا مختلفة الأحجام تماماً وتعليل ذلك أن هذه القواعد أي النيوكليوتيدات غير مرتبة إعتباطياً أي غير موزعة عشوائياً are not randomly ordered كما سبق إفتراضه.

مما سبق يتضح أن الحساب النظري رياضياً يعطى فكرة عن عدد مواقع القطع ولكن التجارب العملية هي الأساس ولا يعتمد على الحساب النظري إطلاقاً.

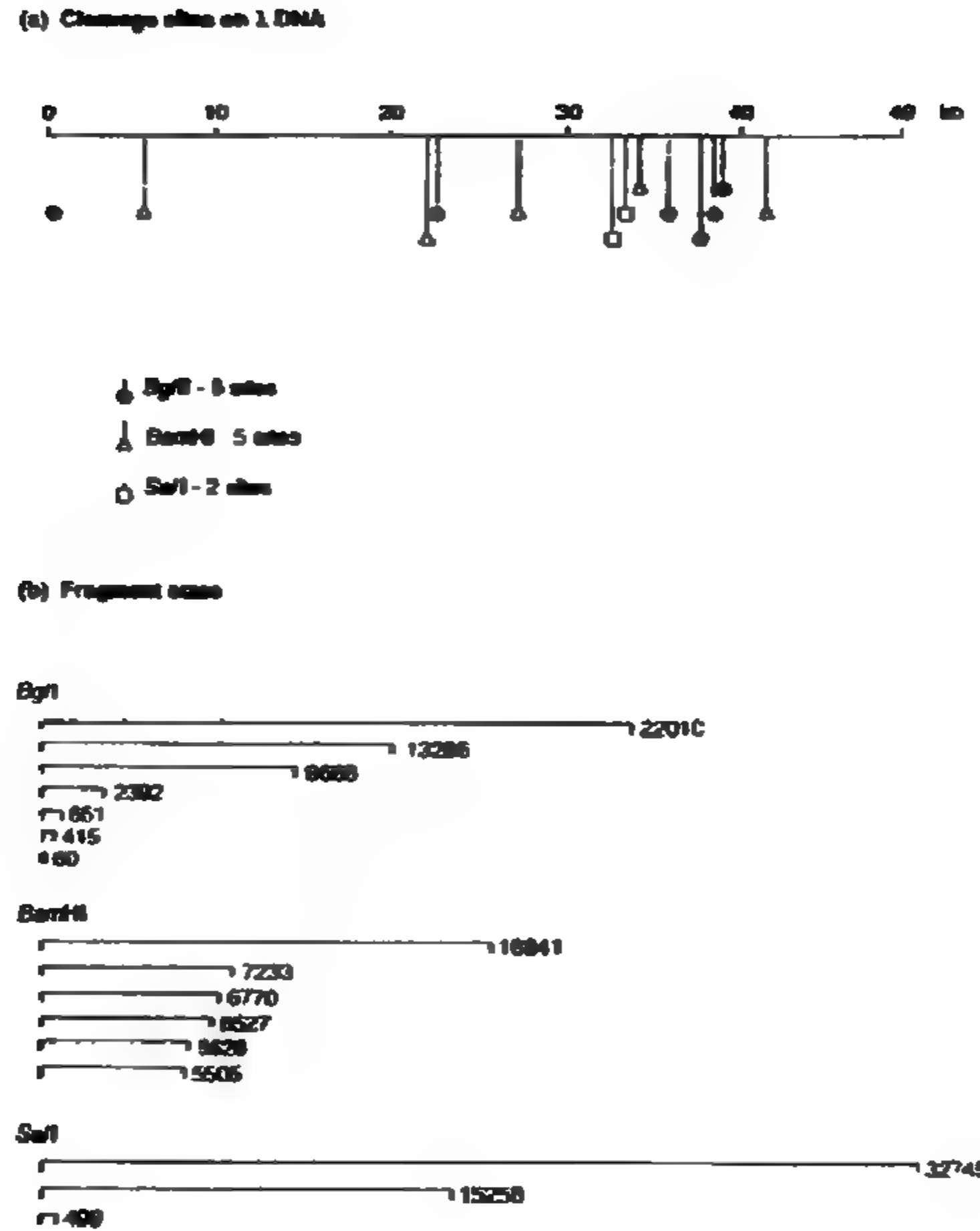
عمل هضم بواسطة إنزيمات القطع الداخلية المشروطة أي المحددة (r.e) في العمل

### Performing a restriction digest in the laboratory

مثال لكيفية هضم عينة دنا لامدا بتركيز ١٢٥ ميكروجرام/مل بواسطة إنزيم القطع *Bgl II*. يتم تنقيط كمية دنا المطلوبة بواسطة ماصة في أنبوبة اختبار. حجم كمية دنا المطلوب تحليلها تعتمد على طبيعة التجربة، وفي هذه الحالة مطلوب هضم أي تحليل ٢ ميكروجرام من دنا لامدا والموجودة في ١٦ ميكرو لتر من العينة، نحتاج في ذلك إلى ماصات شديدة الدقة. يجب الحصول على إنزيمات القطع الداخلية المشروطة وهي عامة تباع تجارياً وتكون على هيئة محلول نقي معروف التركيز. يجب ضبط رقم pH البيئة المناسب لنشاط الإنزيم وهو ٧,٤، وعامة أغلب إنزيمات القطع (التحليل) الداخلي المشروط تكون في قمة نشاطها في pH ٧,٤.

تختلف هذه الإنزيمات في إحتياجاتها للقوة الأيونية ionic strength والتي يمكن عملها بواسطة كلوريد الصوديوم عادة وأيضاً تختلف في مدى أو درجة إحتياجها لكاتيون الماغنيسيوم. جميع إنزيمات الطراز II من إنزيمات القطع الداخلية المشروطة تحتاج كاتيون الماغنيسيوم لنشاطها. من المطلوب ومن المفيد إضافة عامل مختزل مثل dithiothreitol حيث أن يسبب ثبات الإنزيم ويمنع تثبيطه. وجد أن التركيز الغير مناسب م ص كل والماغنيسيوم يسبب تقليل نشاط الإنزيم وعلاوة على

ذلك قد يؤثر على تخصص الإنزيم ويعمل في قطع أماكن أخرى إضافية غير المخصصة له حيث تكون أماكن إضافية لا يقوم الإنزيم بقطع هذه الأماكن في الحالة العادية. يتضح مما سبق أن المحلول المنظم المناسب لإنزيم *Bgl* II هو ما يأتي (جدول ٦).



شكل ٨٤: قطع جزيء دنا الفاج لامدا بإنزيمات القطع الداخلية المشروطة، (أ) أماكن القطع علمياً للإنزيمات *Bgl* II (ستة)، *Bam* HI (خمسة)، *Sal* I (إثنين)، (ب) أحجام الشظايا المختلفة نتيجة لنشاط الإنزيمات السابقة (الأرقام تدل على حجم الشظية مقدراً بواسطة أزواج القواعد (base-pairs)).

جدول ٦: المحلول المنظم المناسب لإنزيم *Bgl II*.

التركيز (ملليمول mM)	المركب
٥٠٠	Tris-HCL, pH 7.4
١٠٠	كلوريد مغنيسيوم $MgCl_2$
٥٠٠	كلوريد صوديوم
١٠	dithiothreitol

هذا التركيز يكون عشرة أضعاف التركيز المستعمل ولذلك يتم تخفيف هذا المحلول المنظم عند إضافته لمخلوط التفاعل بعد ذلك يتم إضافة إنزيم القطع الداخلى المشروط. الوحدة من الإنزيم (1 unit) يمكن تعريفها أنها عبارة عن الكمية التى نحتاجها من الإنزيم لقطع ١ ميكروجرام من دنا فى الساعة وهكذا. ولذلك فإننا نحتاج وحدتين من *Bgl II* لقطع ٢ ميكروجرام من دنا لأمدا فى الساعة. عادة يمكن الحصول على الإنزيم *Bgl II* بتركيز ٤ وحدة لكل ميكرو لتر، ولذلك فى الحالة السابقة فإنه يلزم ١/٢ ميكرو لتر لقطع دنا وتخفيفها بالماء بواسطة ١,٥ ميكرو لتر فيصبح المجموع ٢ ميكرو لتر.

وهكذا فإن المحلول النهائى حجمه يكون ٢٠ ميكرو لتر وهو عبارة عن ٢ ميكرو لتر محلول منظم (الأساسى أى الأصل الذى قوته ١٠ X) و ١٦ ميكرو لتر دنا العينة و ٢ ميكرو لتر من الإنزيم (١/٢ ميكرو لتر) المخفف بالماء (١/٥ ميكرو لتر).

آخر الظروف البيئية اللازمة لنشاط الإنزيم هى درجة حرارة التفاعل أى درجة حرارة التحضين. من المعروف أن درجة التفاعل المثلى لغالبية إنزيمات القطع الداخلى المشروط ومنها *Bgl II* هى ٣٧ درجة مئوية. ولكن لهذه القاعدة إستثناءات ومنها إنزيم *Tag I* الذى يستخلص وينقى من البكتيريا *Thermus aquaticus* والتى تعيش فى بيئة درجة حرارتها مرتفعة مثل الينابيع الحارة. فعند إجراء التجارب بهذا

الإنزيم يجب أن تكون درجة حرارة تحضين مخلوط التفاعل هي ٦٥ درجة مئوية وهي درجة الحرارة المثلى لنشاط الإنزيم.

بعد ساعة ينتهى التفاعل وتصبح أجزاء أى كسورات أى شظايا دنا قابلة للإستعمال فى تجارب التوطين للجينات. لابد التخلص حالاً من الإنزيم الذى قد يعمل عند إضافة دنا أثناء التجارب التالية ويكون ذلك بتسخين المحلول إلى درجة ٧٠ درجة مئوية لفترة قصيرة أو إستخلاص بالفينول أو إضافة مركب EDTA حيث أن الأخير يقوم بخلب أيونات المغنيسيوم ويمنع ذلك نشاط الإنزيم.

**تحليل نتائج القطع (التحليل) بواسطة إنزيمات القطع الداخلية المشروطة أو المحددة:**

Analysing the result of restriction endonuclease cleavage:

يجب تحديد عدد وطول الشظايا الناتجة عن القطع. يمكن معرفة حدوث القطع (التحليل) من عدمه وذلك بقياس اللزوجة بواسطة جهاز قياس اللزوجة viscometer. حيث أن جزيئات كبيرة تسبب لزوجة عالية والعكس صحيح. ولكن الطريقة المثلى لتحديد عدد وطول الشظايا هي إستعمال هجرة الجزيئات فى وسط غروى وفى مجال كهربائى وتسمى هذه الطريقة electrophoresis.

**أ - فصل الجزيئات (الشظايا) بواسطة الهجرة فى مجال غروى فى وسط**

**كهربائى Separation of molecules by gel electrophoresis:**

جزيئات دنا تحمل شحنة سالبة ولذلك عند وضعها فى مجال كهربائى فإنها تهجر ناحية القطب الموجب. درجة سرعة الهجرة للجزيء تتوقف على عاملين شكله والعامل الثانى النسبة بين الشحنة والوزن charge to mass ratio. لسوء الحظ أغلب جزيئات دنا تكون متماثلة فى الشكل وتكون متشابهة فى نسبة الشحنة إلى الوزن. ولذلك فإن الشظايا المختلفة الحجم لا يمكن فصلها بواسطة الهجرة فى مجال كهربائى. ولكن يصبح لحجم الجزيء تأثير إذا إستخدما وسط غروى ومجال كهربائى. ومثال للغرويات gels المستعملة الأجاروز agarose والبولى أكريل أميد



polyacrylamide، يمكن إستخدام كل منهما على حدة أو إستخدام خليط منهما وذلك للتحكم فى درجة المسامية المطلوبة للفصل أثناء هجرة الجزيئات. الجزيئات الأصغر حجماً تهجر بسرعة أكبر من الجزيئات الأكبر حجماً. وهكذا فإن gel الغروى يفصل الجزيئات تبعاً لحجمها فى gel electrophoresis.

تركيب الـ gel هو الذى يحدد حجم الجزيئات دنا المفصولة. وفى حالة الأجاروز عندما يكون سمك الـ slab الطبقة سميكة (سمكها ١/٢ سم) وتتكون من ٠,٥% أجاروز يكون بها ثقوب واسعة نسبياً وتستخدم فى فصل جزيئات حجمها يتراوح من ١ إلى ٣٠ كيلو قاعدة kb، ومثال ذلك أن جزيئات دنا ذات الحجم ١٠-١٢ كيلو قاعدة يمكن أن تنفصل بسهولة عن بعضها ويمكن تمييزها بسهولة. وفى حالة وجود طبقة رقيقة جداً سمكها ٠,٣ مم وتتكون من ٤٠% بولى أكريل أميد gel فإنها تكون ذات ثقوب صغيرة جداً نسبياً وتستخدم فى فصل جزيئات دنا صغيرة الحجم والتي تتراوح فى أحجامها من ١ إلى ٣٠٠ زوج قواعد bp وتكون من الدقة بحيث أنها تفصل إختلاف فى أطوال عديد النيوكليوتيدات بدرجة زيادة أو نقص نيوكليوتيدة فى الطول فقط، أى درجة عالية من دقة الفصل والتمييز.

#### **ب - التعرف على دنا فى الجل Visualizing DNA molecules in a gel:**

يمكن التعرف على دنا فى الجل بالصبغ أو بإستخدام autoradiography

١ - الصبغ: لتوضيح جزيئات دنا المفصولة على الجل لابد من صبغها بصبغة مناسبة لتسبب وضوح جزيئات دنا مثل بروميد الإيثيديم ثم تعريض الجل إلى الأشعة فوق البنفسجية حيث يمكن رؤية أشرطة bands جزيئات دنا المفصولة. يستخدم بروميد الإيثيديم للصبغ فى كلا الحالتين بإستخدام الأجاروز أو إستخدام البولى إكريل أميد. يمكن رؤية أشرطة جزيئات دنا منفصلة تماماً فى وجود الأشعة فوق البنفسجية بشرط وجود كميات أى تركيز كاف من جزيئات دنا، فى حالة التركيزات المنخفضة جداً يصعب رؤية الشرائط.

٢ - Autoradiography: أحد مساوئ الصبغ بواسطة بروميد الإيثيديوم أن حساسيته محدودة، ففي حالة وجود تركيزات أقل من حوالى ٢٥٠ نانوجرام من دنا للشريط الواحد فإن حساسيته تكون ضعيفة جداً وتصبح طريقة الصبغ غير فعالة في تمييز الشرائط. ولذلك لابد من وجود طريقة أخرى أكثر حساسية وهى طريقة autoradiography. وفيها يتم تعليم دنا قبل الفصل بواسطة e.ph. وذلك بربط الجزيئات بمعلّقات (دلالات) مشعة radioactive markers وبذلك يمكن رؤية أى تصوير دنا بوضع فيلم فوتوغرافى حساس (فيلم تصوير) لأشعة X أعلى الـ gel أى أعلى الـ slab سيصور حزم دنا، وتظهر حزم دنا بلون غامق مسود. عملية إدخال المعلّقات أى الدلالات المشعة هى عبارة عن إدخال نيوكليوتيدات تحتوى على فوسفور مشع من نوع ف٣٢ إلى جزيئات دنا ويكون ذلك بطرق عديدة أفضلها طريقة تسمى ترجمة القطع وطريقة أخرى تسمى طريقة ملأ النهاية nick translation and end filling.

طريقة ترجمة القطع تشير إلى نشاط إنزيم بلمرة دنا رقم I (DNA polymerase I) أغلب عينات دنا النقية تحتوى بعض الجزيئات المقطوعة، ويتوقف ذلك على درجة كفاءة عمل هذه التحضيرات، فكلما كان التحضير جيد وتم تحضيره بدقة فإن هذا الإنزيم سيكون له القدرة الكبيرة على الالتحام وأيضاً تخليق شريط من دنا يحتاج هذا التفاعل إلى مدد من النيوكليوتيدات باستمرار وإذا كانت واحدة من هذه النيوكليوتيدات مشعة فإن جزيء دنا المتكون يكون مشع أيضاً. هذه الطريقة يمكن أن تستخدم لتعليم جزيء دنا ولكن فى بعض الظروف تسبب إنشقاق الجزيء دنا DNA cleavage.

طريقة ملأ النهاية end-filling تعتبر طريقة أفضل من السابقة لأنها أكثر دقة رقة a gentler method فهى نادراً ما تسبب إنشقاق جزيء دنا ولكن من عيوبها أنه لا يمكن تطبيقها إلا فى حالة الأطراف اللزجة لجزيئات دنا يستخدم فى هذه الحالة إنزيم شظية كليناو klenow fragment والذي يسبب ملأ النهايات للزجة لجزيئات دنا وذلك

بتخليق شريط تكميلي. وإذا تم ملأ النهايات بواسطة نيوكليوتيدات مشعة فإنه جزيء دنا المتكون يصبح مشع.

كلا الطريقتين السابقتين ينتج عنهما جزيئات دنا مشعة وحتى لو كان تركيز جزيئات دنا قليل جداً فإن طريقة autoradiography يمكنها التعرف على وجود حزم جزيئات دنا في الجل gel. فإنه في حالة وجود تركيز جزيئات دنا منخفض، حوالى ٢ نانوجرام من دنا لكل حزمة، فإنه يمكن تصويرها ورؤيتها في الظروف المثالية.

### **تقدير حجم جزيئات دنا : Estimation of sizes of DNA molecules**

في حالة gel e. ph فإن جزيئات دنا تتفصل في الجل تبعاً لأحجام جزيئات دنا المختلفة، فإن الأحجام الصغيرة تهجر بسرعة نحو القطب الموجب وتقطع مسافة طويلة نسبياً والعكس صحيح في الجزيئات الكبيرة حيث ستقطع مسافة قصيرة وهكذا. نتيجة للقطع ستتكون أحجام مختلفة من جزيئات دنا ستهجر في الجل بسرعات مختلفة ولذلك سنتج لدينا عدد من الحزم المتتابة في الجل الواحد ويلزم تقدير أحجام هذه الجزيئات في الحزم المختلفة. توجد طرق لتقدير هذه الأحجام ولكن أدق هذه الطرق هي عمل حسابات لربط العلاقة بين سرعة الهجرة في الجل وحجم الجزيء وهذه يمكن حسابها من المعادلة الآتية:

$$D = a - b (\log M)$$

حيث أن:

$D$  هي مسافة الهجرة.

$M$  هي الوزن الجزيئي لدنا.

$a, b$  ثوابت تتوقف على حالة وظروف e. ph.

توجد طريقة أخرى تستخدم بكثرة ولكنها أقل دقة من الطريقة السابقة في تقدير حجم جزيئات دنا. وملخص هذه الطريقة أنه يتم عمل هضم أى تحليل لجزيئات دنا بواسطة إنزيمات القطع الداخلية المشروطة ويكون ذلك كأساس للمقارنة standard



restriction digest، وفيها يتم عمل هجرة لجزيئات معروفة الحجم في نفس الجل. وهكذا عند كل اختبار قطع يتم وضع هذه الجزيئات المعروفة الحجم كأساس للمقارنة في الجل. هضم أى تحليل دنا الفاج لامدا يستخدم عادة في هذه الطريقة كأساس للمقارنة لحجم الجزيئات size markers. ومثال ذلك أن الإنزيم *Hind II* يسبب قطع دنا الفاج لامدا إلى ثمانية أجزاء أو شظايا تتراوح أحجامها من ١٢٥ زوج قاعدة pb وهي الصغيرة الحجم إلى ٢٥ كيلو قاعدة kb وهي الأكبر. وحيث أن أحجام الشظايا في هذا التحليل معروف، فإن أحجام الشظايا في العينة المختبرة يمكن معرفتها بمقارنة مسافة الهجرة في العينة المعروفة والعينة المختبرة وذلك بمقارنة موقع الحزم في العينة وموقع الحزم في العينة المعروفة الخاصة بدنا الفاج (شكل ٨٥) يمكن مقارنة الموقع وتقدير الحجم التقريبي بواسطة العين المجردة. ولكن الطريقة الأدق هي عمل منحنى قياسى standard curve للعينة المعروفة وذلك بوضع مسافة الهجرة على المنحنى السينى وحجم شظية دنا على المنحنى الصادى ثم نقيس المسافات في العينة المختبرة ونوقعها على المنحنى ومنها نتعرف على حجم الشظايا الخاصة بالعينة المجهولة أى المختبرة.

#### تحديد أماكن القطع المختلفة على جزيء دنا

#### Mapping the positions of different restriction sites on DNA molecule

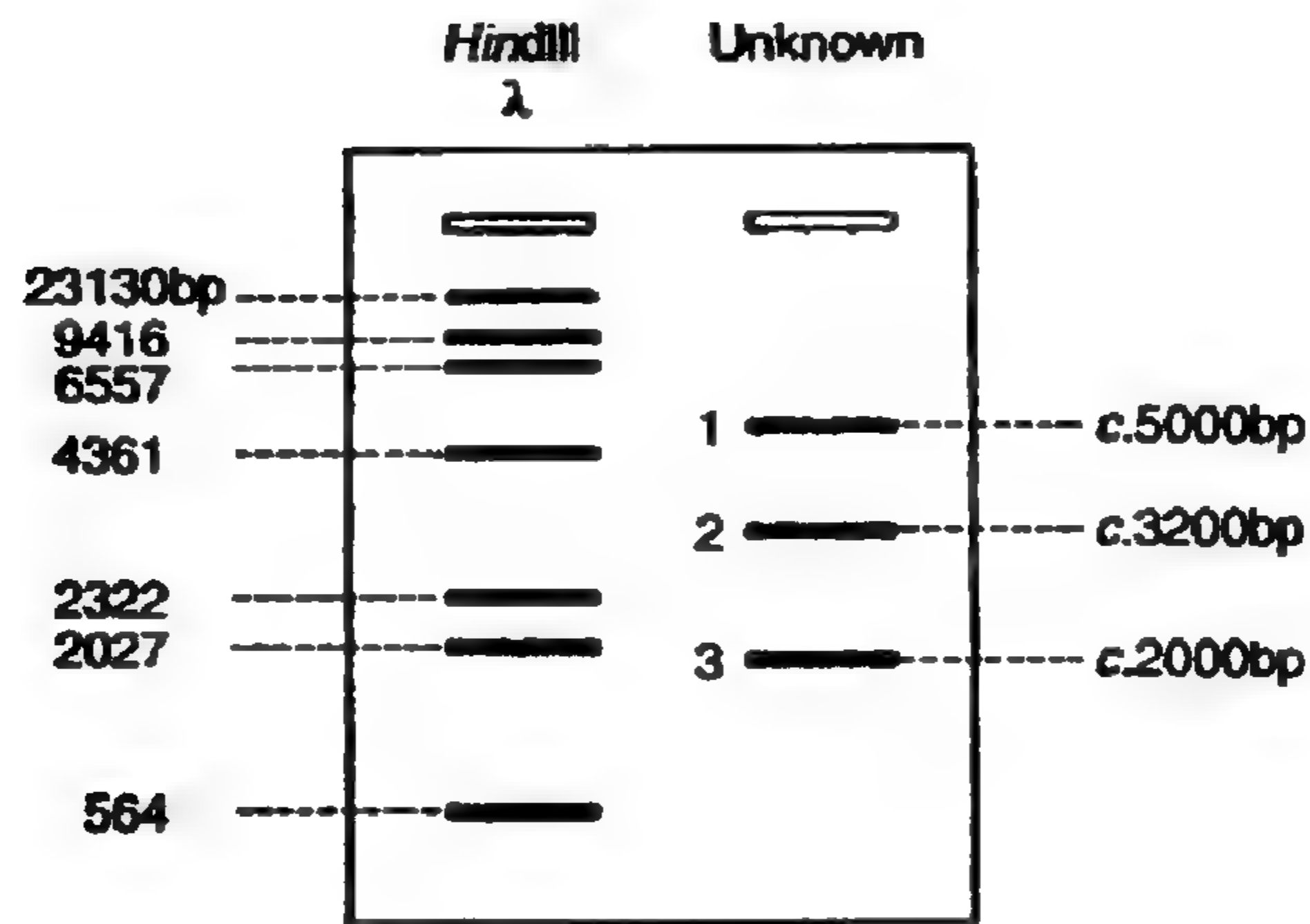
من الخطوات السابقة أمكن التعرف على عدد وحجم شظايا دنا المطلوب إختباره. تكون الخطوات التالية لذلك هو عمل تحليل أى تحديد مواقع القطع (مواقع قطع محددة) restriction analysis، ويكون ذلك بعمل خريطة توضح المواقع النسبية على جزيء دنا لمواقع التعرف المختلفة recognition sequences لعدد من إنزيمات القطع الداخلية المشروطة المختلفة.

عندما يكون لدينا خريطة قطع restriction map، وهى عبارة عن شكل يوضح أماكن القطع المختلفة لإنزيمات قطع داخلية مشروطة مختلفة على جزيء دنا، فإنه يمكن إختيار الإنزيم المناسب أو الإنزيمات المناسبة لقطع وفصل الجين المطلوب أو

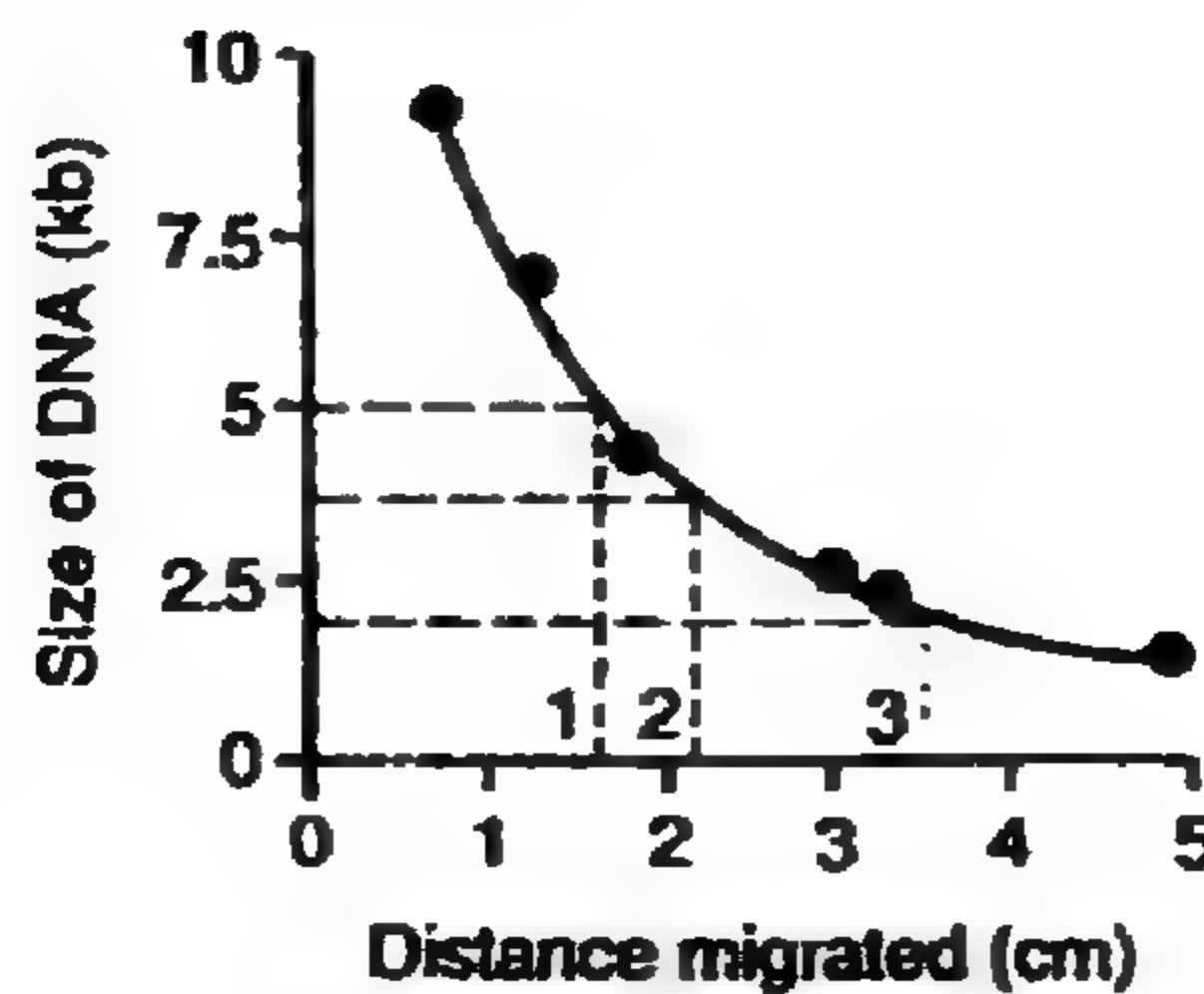


الجينات المطلوبة كما في الشكل (شكل ٨٦). يوجد خريطة وراثية *genetic map* توضح مواقع الجينات كما يوجد خريطة قطع توضح أماكن قطع أى أماكن عمل لثلاثة إنزيمات قطع داخلية مشروطة أى محددة وهى *Bgl II* و *Sat I* وعند مقارنة خريطة القطع مع الخريطة الوراثية يمكن التعرف على الإنزيمات التى تستخدم فى فصل الجين B سليم وفصل الجين C سليم. فى حالة الجين B يستخدم الإنزيم *Bgl II* فى حالة الجين C يستخدم الإنزيمين *Bam HI*، *Sat I*.

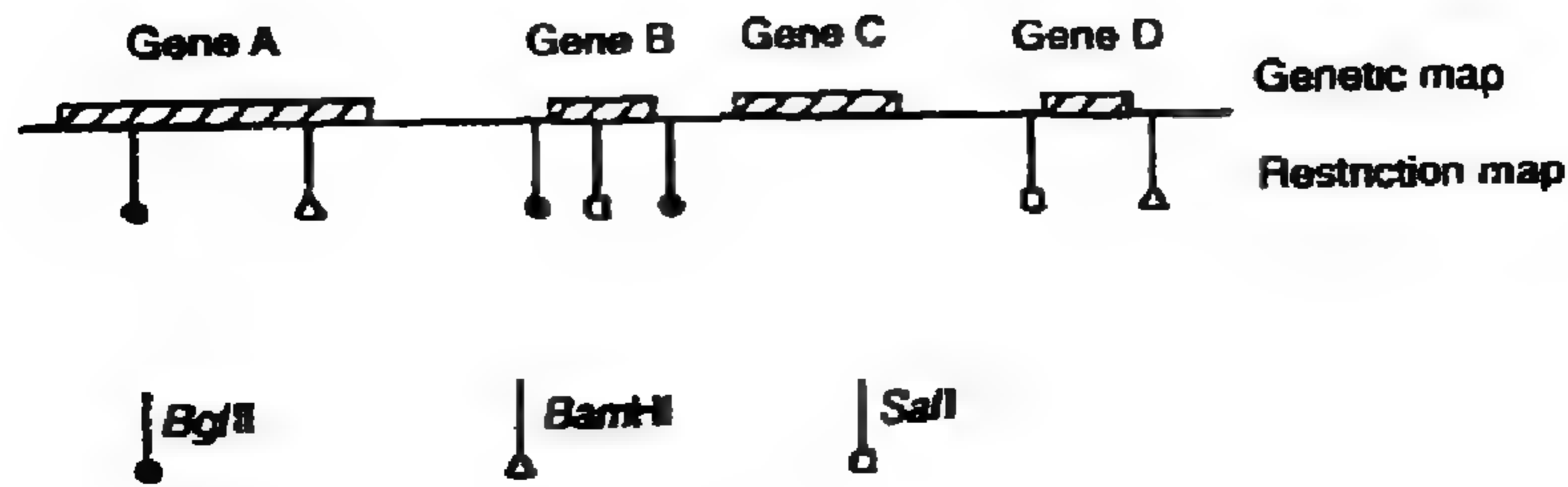
(a) Rough estimation by eye



(b) Accurate graphical estimation



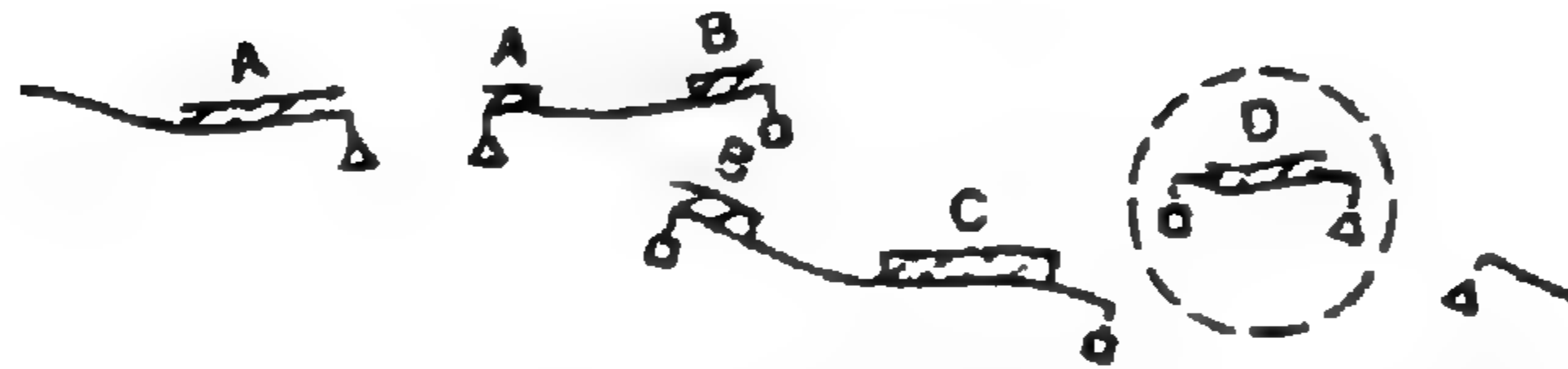
شكل ٨٥: (أ) تقدير حجم شظايا دنا بالعين المجردة، (ب) تقدير حجم شظايا دنا للعين بواسطة المنحنى القياسى.



To obtain gene B, digest with *Bgl*II



To obtain gene D, digest with *Bam*HI + *Sal*I



شكل ٨٦: خريطة قطع محدد restriction map وفيها يستخدم إنزيمات قطع داخلي مشروطة أي متعددة وذلك للحصول على شظايا دنا تحتوي جين واحد سليم.

لعمل خريطة يجب عمل سلسلة من القطع a series of restriction digest أي سلسلة من الهضم أي القطع. أول شيء في ذلك هو لابد من تحديد عدد وأحجام الشظايا الناتجة من كل قطع بواسطة كل إنزيم من إنزيمات القطع الداخلية المشروطة ويكون ذلك بواسطة gel electrophoresis وتسمى هذه بالهضم أو القطع المفرد single digestion بعد ذلك يتم المقارنة بين هذه الشظايا والمعلومات الحجمية أي الدلالات الحجمية size markers (شكل ٨٧).

هذه المعلومات يجب أن تدعم بسلسلة من الهضم المزدوج (القطع المزدوج) double digestions والمقصود بها أن كل جزيء من دنا يتم قطعه إلى شظايا بواسطة إنزيمين من إنزيمات القطع الداخلية المشروطة في آن واحد يمكن عمل ذلك لإنزيمين في آن واحد لو أن إحتياجات الإنزيمين متماثلة من حيث pH وتركيز

كاتيون المغنيسيوم وغيرها من الإحتياجات اللازمة للتفاعل. بديل عن ذلك أو علاوة على ذلك يمكن عمل التفاعلين للإنزيمين تفاعل تلو التفاعل الآخر وذلك بضبط مخلوط التفاعل بعد التفاعل الأول ليكون مناسب للتفاعل الثانى. مقارنة الهضم الواحد أى القطع الواحد single digest أى بإنزيم واحد بالهضم بإنزيمين أى الهضم المزدوج double digests ستساعد المقارنة على تحديد مواقع القطع للإنزيمات ويمكن منها رسم خريطة لذلك allow restriction sites to be mapped (شكل ٨٧).

قد توجد بعض الحالات المبهمة عند رسم الخريطة فيمكن حلها بعمل هضم جزئى partial digestion أى قطع جزئى.

ويمكن عمل ذلك فى ظروف خاصة مناسبة والتي ينتج عنها قطع فى مواقع قطع محدودة العدد على جزيء دنا. الهضم الجزئى يتم عمله بواسطة فترة تحضين قصيرة وبذلك لا يتمكن للإنزيم من قطع كل مواقع القطع. يمكن عمل الهضم الجزئى بطريقة أخرى وهى التحضين فى درجة منخفضة حوالى ٤ درجات مئوية وليست ٣٧ درجة مئوية وهى بذلك تحد بدرجة كبيرة من نشاط الإنزيم. نتيجة الهضم الجزئى أن تتكون حزم لها نظام أو توزيع أو شكل معقد complex pattern of bands فى الجل الخاص بـ gel electrophoresis حيث أنه ستتكون أحجام من شظايا دنا إضافية لا توجد فى حالة الهضم الكلى. هذه الأحجام الإضافية من الشظايا تتكون من شظايا مختلفة الأحجام أو منها على سبيل المثال شظيتين أى جزئين من دنا ملتحمين بينهما موقع قطع لم يتم قطعه أى شظيتين ملتحمتين عند موقع قطع لم يتم قطعه.

أحجام هذه الشظايا الإضافية الناتجة من القطع أى الهضم الجزئى توضح ترتيب حدوث الطع فى القطع الكامل complete digestion أى الهضم الكلى (القطع الكلى) وذلك عند مقارنة القطع الجزئى مع القطع الكلى وذلك بمقارنة أحجام الشظايا فى الأول مع أحجام الشظايا فى الثانى (شكل ٨٧).



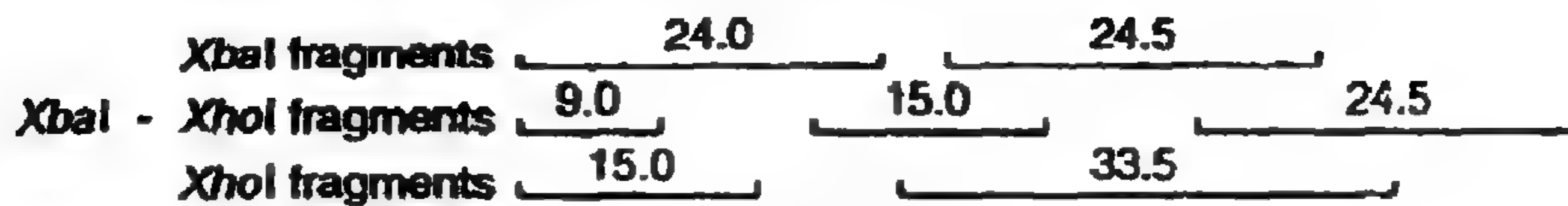
Single and double digestions

Enzyme	Number of fragments	Sizes (kb)
<i>Xba</i> I	2	24.0 24.5
<i>Xho</i> I	2	15.0 33.5
<i>Kpn</i> I	3	1.5 17.0 30.0
<i>Xba</i> I + <i>Xho</i> I	3	9.0 15.0 24.5
<i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	4	1.5 6.0 17.0 24.0

Conclusions:

1. As  $\lambda$  DNA is linear, the number of restriction sites for each enzyme is  
*Xba*I 1, *Xho*I 1, *Kpn*I 2.

2. The *Xba*I and *Xho*I sites can be mapped:



The only possibility is:

Diagram showing the only possibility for the mapping of *Xba*I and *Xho*I sites. The fragments are 15.0, 9.0, and 24.5 kb, with *Xho*I and *Xba*I sites indicated.

3. All the *Kpn*I sites fall in the 24.5 kb *Xba*I fragment, as the 24.0 kb fragment is intact after *Xba*I - *Kpn*I double digestion. The order of the *Kpn*I fragments can be determined only by partial digestion.

Partial digestion

Enzyme	Fragment sizes (kb)
<i>Kpn</i> I - limiting conditions	1.5, 17.0, 18.5, 30.0, 31.5, 48.5

Conclusions:

48.5 kb fragment = uncut  $\lambda$ .  
1.5, 17.0 and 30.0 kb fragments are products of complete digestion.  
18.5 and 31.5 kb fragments are products of partial digestion.

The *Kpn*I map must be:

Diagram showing the *Kpn*I map. The fragments are 30.0, 1.5, and 17.0 kb, with *Kpn*I sites indicated.

Therefore the complete map is:

Diagram showing the complete map. The fragments are 15.0, 9.0, 6.0, 1.5, and 17.0 kb, with *Xho*I, *Xba*I, and *Kpn*I sites indicated.

شكل ٨٧: خريطة قطع Restriction mapping توضح كيف أن الموقع الثلاثة *Xba*I، *Xho*I، *Kpn*I على جزيء دنا الفاج لامدا يمكن تحديدها.

### وفيما يلي شرم للشكل (شكل ٨٧).

مطلوب عمل خريطة قطع لثلاثة مواقع وهي *Xba I*، *Xho I*، *Kpn I* على جزيء دنا الفاج لامدا. سنقوم بعمل هضم مفرد وهضم مزدوج بواسطة الإنزيمات *Xba I*، *Xho I*، *Kpn I* وسيكون الناتج تكوين عدد من الشظايا ذات أحجام مختلفة كما في الجدول.

جدول ٧: إنزيمات القطع الداخلى المشروطة ونشاطها.

الإنزيم	عدد الشظايا	أحجام الشظايا (كيلو قاعدة kb)
<i>Xba I</i>	٢	٢٤ ، ٥ ، ٢٤
<i>Xho I</i>	٢	٣٣ ، ٥ ، ١٥
<i>Xpn I</i>	٣	٣٠ ، ١٧ ، ١، ٥
<i>Xbia I + Xho I</i>	٣	٢٤ ، ٥ ، ١٥ ، ٩
<i>IXba I + Kpn</i>	٤	٢٤ ، ١٧ ، ٦ ، ١، ٥

من الجدول السابق يتضح ما يلى (جدول ٧):

١ - حيث أن جزيء دنا الفاج لامدا شريطى (خيضى) فإن عدد مواقع القطع لكل إنزيم من الإنزيمات السابقة هى ١ للإنزيم *IXba I*، ٢ للإنزيم *Xho I*، ٢ للإنزيم *Xpn I*.

٢ - مواقع القطع *Xba I*، *Xho I* يمكن تحديدها من تحليل عدد وحجم الشظايا كما فى رقم ٢ فى الشكل وذلك نتيجة الهضم المفرد والهضم المزدوج. يكون الاحتمال الوحيد للموقعين كما فى رقم ٢ فى الشكل.

٣ - مواقع الإنزيم *Kpn I*، أى مواقع القطع لهذا الإنزيم تقع جميعها فى الشظية ٢٤، ٥ كيلو قاعدة. حيث أن الشظية ٢٤ كيلو قاعدة تكون سليمة بعد استخدام الهضم المزدوج بالإنزيمين *Kpn I*، *Xba I*. ترتيب القطع لتكوين الشظايا الناتجة عن الإنزيم *Kpn I* يمكن التعرف عليها فقط بعمل الهضم الجزئى.

بعد عمل الهضم الجزئى بواسطة الإنزيم *Kpn I* فإن الشظايا الناتجة تكون أحجامها ١,٥ ، ١٧ ، ١٨,٥ ، ٣٠ ، ٣١,٥ ، ٤٨,٥ كيلو قاعدة. نتيجة لذلك إنه يوجد شظية ٤٨,٥ كيلو قاعدة لم تقطع. ناتج القطع الكامل أى القطع الكلى هى ثلاثة أحجام من الشظايا وهى ١,٥ ، ١٧ ، ٣٠ كيلو قاعدة، يلاحظ أن هذا قطع مفرد كلى لهذا الإنزيم. ناتج القطع الجزئى أحجام عديدة وهى ستة أحجام منها أربعة متماثلة مع القطع المفرد الكلى لهذا الإنزيم ومنها شظيتين ذات حجمين جديدين وهما ١٨,٥ ، ٣١,٥. ونتيجة لمجموع ما سبق فإن موقع *Kpn I* يكون كما فى الشكل ولا يكون إلا هذا الموقع نتيجة لتحليل أحجام الشظايا بالهضم الكلى والهضم الجزئى.

ولذلك تكون مواقع القطع لهذه الثلاثة إنزيمات على خريطة القطع كما فى الشكل (شكل ٨٧).

### **الربط أو الإلتحام أو اللصق لجزيئات دنا**

#### **Ligation**

وهو عبارة عن لصق أى لحم أى ربط جزيئين دنا منفصلين أحدهما ناقل متحرك *vector molecule* والآخر الجين أو الجينات المراد لحماها والإنزيم الذى يقوم بهذه العملية يسمى ليغيز دنا *DNA ligase*.

#### **طريقة عمل دنا ليغيز *DNA ligase* : The mode of action of DNA ligase**

جميع الخلايا الحية تنتج دنا ليغيز وهى أنواع عديدة من دنا ليغيز (ليغيز دنا) *DNA ligases* ولكن الإنزيم المستعمل فى الهندسة الوراثية ينقى عادة من البكتيريا *E. coli* كولاى التى تم إصابتها بالفاج T4. حيث أن هذا الإنزيم يقوم بإصلاح جزيء دنا *repairing* وهى وظيفة هامة جداً لهذا الإنزيم حيث أنه يقوم بإصلاح عدم إستمرارية جزيء دنا فى أحد الشريطين أى حلزونى دنا أى يجعله مستمر. تعرف عدم إستمرارية *discontinuities* جزيء دنا هو أن الرابطة الفوسفورية ثنائية الأستر

phosphodiester bond بين نيوكليوتيدتين متجاورتين غائبة. تختلف عدم الإستمرارية discontinuities عن القطع nick حيث أنه في الأخير يوجد نيوكليوتيدة واحدة أو أكثر غائبة. يمكن أن تحدث عدم إستمرارية جزيء دنا في الخلية نتيجة للصدفة أى كسر بالصدفة chance breakage ولكنها هى أيضاً نتيجة عادية طبيعية فى حالة تضاعف جزيء دنا وأيضاً فى حالات إعادة صياغة جزيء دنا DNA replication and recombination. وهكذا فإن إنزيمات ليجيز دنا لها أدوار حيوية عديدة وفعالة فى الخلية.

تحدث عملية الإلتحام فى أنبوبة الاختبار بواسطة إنزيمات الربط أى إنزيمات الإلتحام أى إنزيمات اللصق ligases حيث أنها تقوم بأنواع مختلفة من عملية الإلتحام بين جزيئات دنا وهى ما يأتى:

١ - إصلاح عملية عدم إستمرارية جزيء دنا فى أحد الحزونين.

٢ - ترتبط أى تلحم جزيئين دنا مختلفين ومنفصلين.

٣ - ترتبط أى تلحم نهايتين منفصلتين لنفس جزيء دنا.

آلية حدوث الإلتحام بواسطة هذه الإنزيمات واحدة فى جميع الحالات السابقة حيث أنه عبارة عن لصق أى لحم عن طريق الرابطة الفوسفورية ثنائية الإستر فى حالة عدم إستمرارية الجزيء أما فى حالة لحم جزيئين مختلفين من دنا أو نهايتين منفصلتين من جزيء دنا فإن يلزم تخليق رابطتين فوسفوريتين ثنائية الإستر وتكون رابطة لكل شريط أو حلزون.

النهايات أى الأطراف اللزجة تزيد من كفاءة الإلتحام

Sticky ends increase the efficiency of ligation .

تحدث عملية الإلتحام بقلّة جداً فى حالة النهايات المستقيمة حيث أن إنزيم الإلتحام لا يمكن أن يقوم بعملية الإلتحام إلا بعد تقابل الأطراف المستقيمة مع بعضها على إستقامة واحدة حيث أنه غير قادر على عمل هذه العملية أى catch hold للنهايتين



المستقيمتين ومقابلتهما لبعضهما. ولذلك لابد من انتظار الفرصة والحظ لكي تتقابل الأطراف تماماً وتكون على إستقامة واحدة ثم يقوم الإنزيم بلصقها. عامة يمكن زيادة النسبة أو الدرجة بزيادة التركيز.

ولكن في حالة الأطراف اللزجة تكون الحالة أسهل وتعداد تكرارية حدوثها كبير جداً حيث أن الأطراف اللزجة المتوافقة تلتصق ببعضها بواسطة روابط إيدروجينية مكونة تراكيب ثابتة ونتيجة لذلك يعمل إنزيم ليجيز دنا بسهولة لتكوين الرابطة الفوسفورية ثنائية الإستر ويحدث الإلتحام بسهولة وبدرجة كبيرة وتكرارية عالية. إذا لم تتكون الرابطة الفوسفورية ثنائية الإستر بسرعة فإن الأطراف اللزجة ستبتاعد مرة أخرى وتتفصل.

### **تخليق أطراف لزجة على الأطراف المستقيمة:**

#### **Putting sticky ends on to a blunt-ended molecule**

بإستخدام إنزيم (أو خليط من إنزيمات) النيوكلييز الداخلى المشروط إنزيم القطع الداخلى المشروط لدنا فإنه يمكن الحصول على أطراف لزجة ناتجة من الهضم بواسطة الإنزيم أو الإنزيمات لكل من دنا الناقل المتحرك ودنا المطلوب توطينه. ولكن لا يحدث ذلك دائماً بل نتيجة لما سبق يحدث عادة تكوين أطراف لزجة للناقل المتحرك vector ولكن شظايا دنا المطلوب توظيفها تكون ذات أطراف مستقيمة. ولذلك لابد من تحويل الطرف المستقيم لهذه الشظايا لى يصبح طرف لزج ويكون ذلك بإحدى ثلاثة طرق وهى ما يأتى:

١ - الوصلات linkers: هى عبارة عن قطع صغيرة من دنا ثنائى الحلزون لها تتابع نيوكليوتيدات معروف تماماً، يتم تخليق هذه الوصلات فى أنابيب الاختبار مثال لذلك الوصلة *Bam HI* (شكل ١٨٨) حيث أن الوصلة لها أطراف مستقيمة ولها موقع قطع restriction site هو *Bam HI* فى هذا المثال.

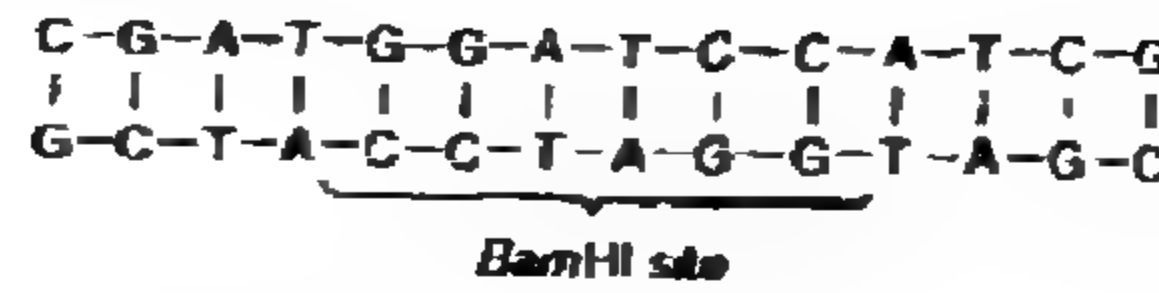
يقوم إنزيم ليجيز دنا بلصق الوصلة بأطراف لجزيئات دنا كبيرة الحجم ذات

أطراف مستقيمة. بالرغم من حدوث الإلتحام بين أطراف مستقيمة blunt-ended ligation حيث أن الوصلات لها أطراف مستقيمة فإن الإلتحام يحدث بسهولة وبكثرة، حيث أن هذه الوصلات يمكن تخليقها بسهولة في المعمل وبكثرة، تضاف هذه الوصلات بكثرة وبتركيز مرتفع جداً في مخلوط التفاعل وذلك يحدث الإلتحام بكثرة. يمكن أن يلتحم مع جزيء دنا أكثر من وصلة واحدة واحدة تلو الأخرى وهذه تكون مرتبة على هيئة سلسلة من الوحدات (شكل ٨٨). عند إستخدام إنزيم القطع Bam HI يسبب إنشقاق الوصلات في مكان القطع المخصص لها لينتج عنها أطراف لزجة. ينتج عن ذلك عديد من الوصلات اللزجة كما أن جزيء دنا يصبح ملتصق بطرفيه وصلتين لزجتين (شكل ٨٨)، تكون النتيجة هي تكوين أعداد كبيرة من وصلات لزجة علاوة على ذلك جزيء دنا يكون على طرفيه وصلات لزجة.

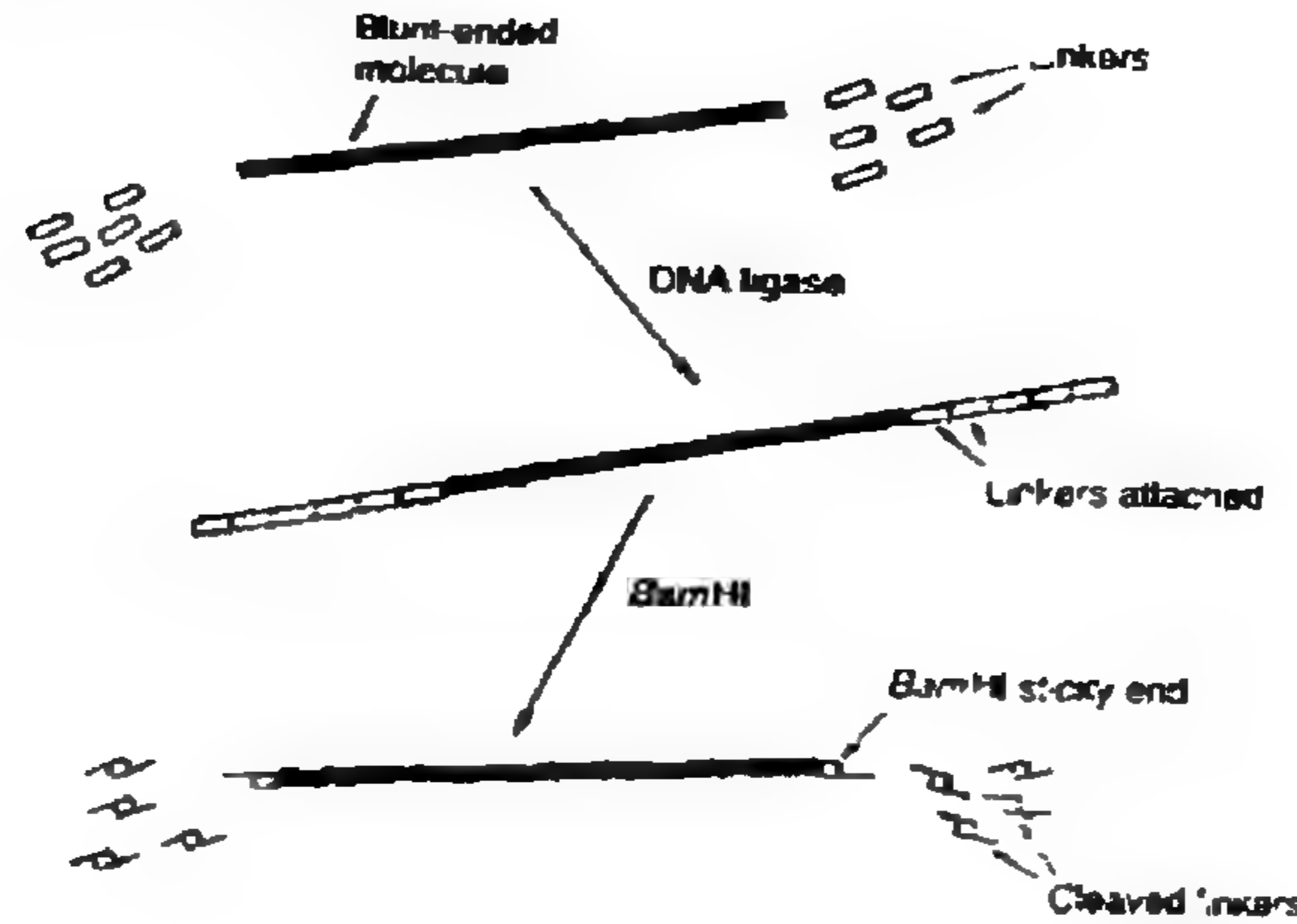
هذه الشظية المحورة من دنا ذات الطرفين اللزجين تكون قابلة للإلتحام بسهولة جداً مع جزيء دنا الناقل الوسيط والذي يكون تم قطعه أيضاً بواسطة الإنزيم Bam HI.

٢ - المأقلمات adaptors: من عيوب الوصلات أنه يمكن لإنزيم القطع أن يقطع أيضاً جزء من الجزيء المطلوب، حيث يحتوى هذا الجزيء من دنا على نفس تتابع الوصلات فيقطع مثلاً إنزيم Bam HI الوصلات وأيضاً جزيء دنا في الأماكن المخصصة له وبذلك يمكن أن يكون الجين المطلوب في دنا قد تجزأ وبذلك يفسد الجين ولا يصلح وتفسد التجربة. ولذلك تفضل المأقلمات عن الوصلات لأنها تتلافى هذا العيب. المأقلمات مثل الوصلات تتكون من جزيء قصير قيل النيوكليوتيدات ولكن يتم تخليقها بحيث يكون لها أطراف لزجة (شكل ٨٩). المأقلم له طرف مستقيم وطرف لزج وفي هذه الحالة يلتحم الطرف المستقيم من المأقلم مع الطرف المستقيم لجزيء دنا ويحدث ذلك في كلا الطرفين لجزيء دنا، تكون النتيجة أن يصبح جزيء دنا له طرفين لزجين ناتجين عن مأقلمين.

(a) A typical linker

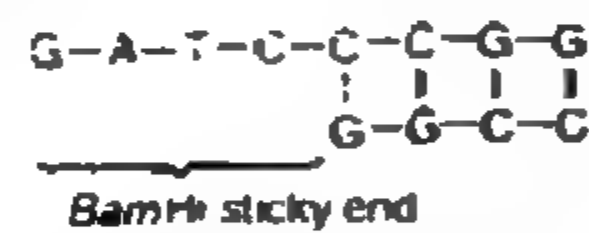


(b) The use of linkers

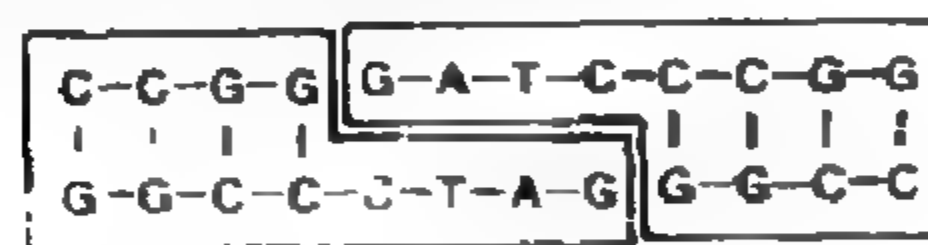


شكل ٨٨: الوصلات وإستعمالها، (أ) تركيب مثالي لوصلة، (ب) إلتحام الوصلات بالأطراف المستقيمة لجزيء دنا

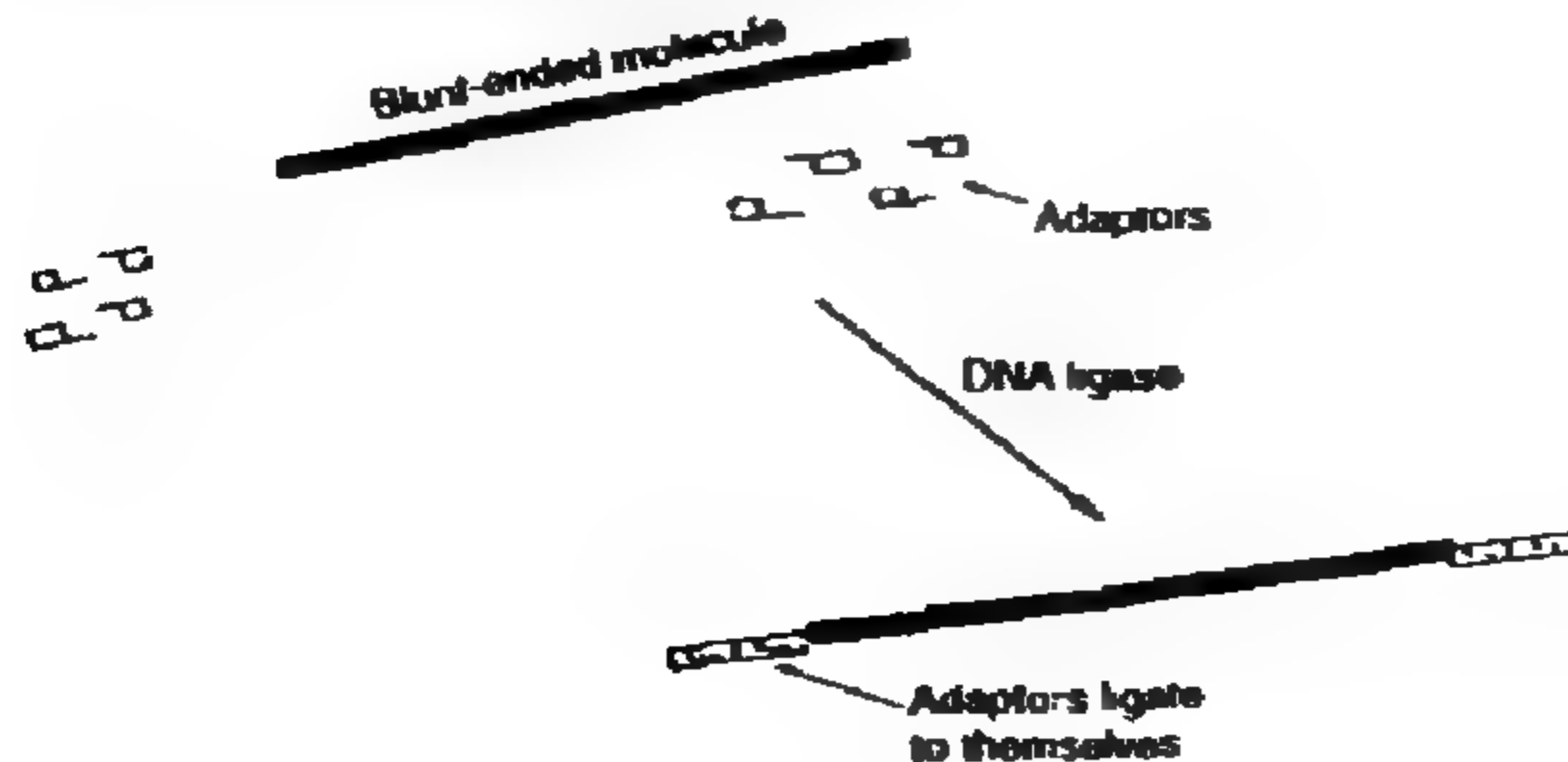
(a) A typical adaptor



(b) Adaptors could ligate to one another



(c) The new DNA molecule is still blunt-ended



شكل ٨٩: المأقلمات، (a) مأقلم مثالي، (b) إثنين من المأقلمات يمكن أن يتحدوا يكون جزيء مشابه للوصلة، (c) بعد إلتحام المأقلمات يظل الطرف المستقيم كما هو مستقيم ونحتاج إلى إنزيم قطع داخلي مشروط أى محدد لعمل أطراف لزجة.



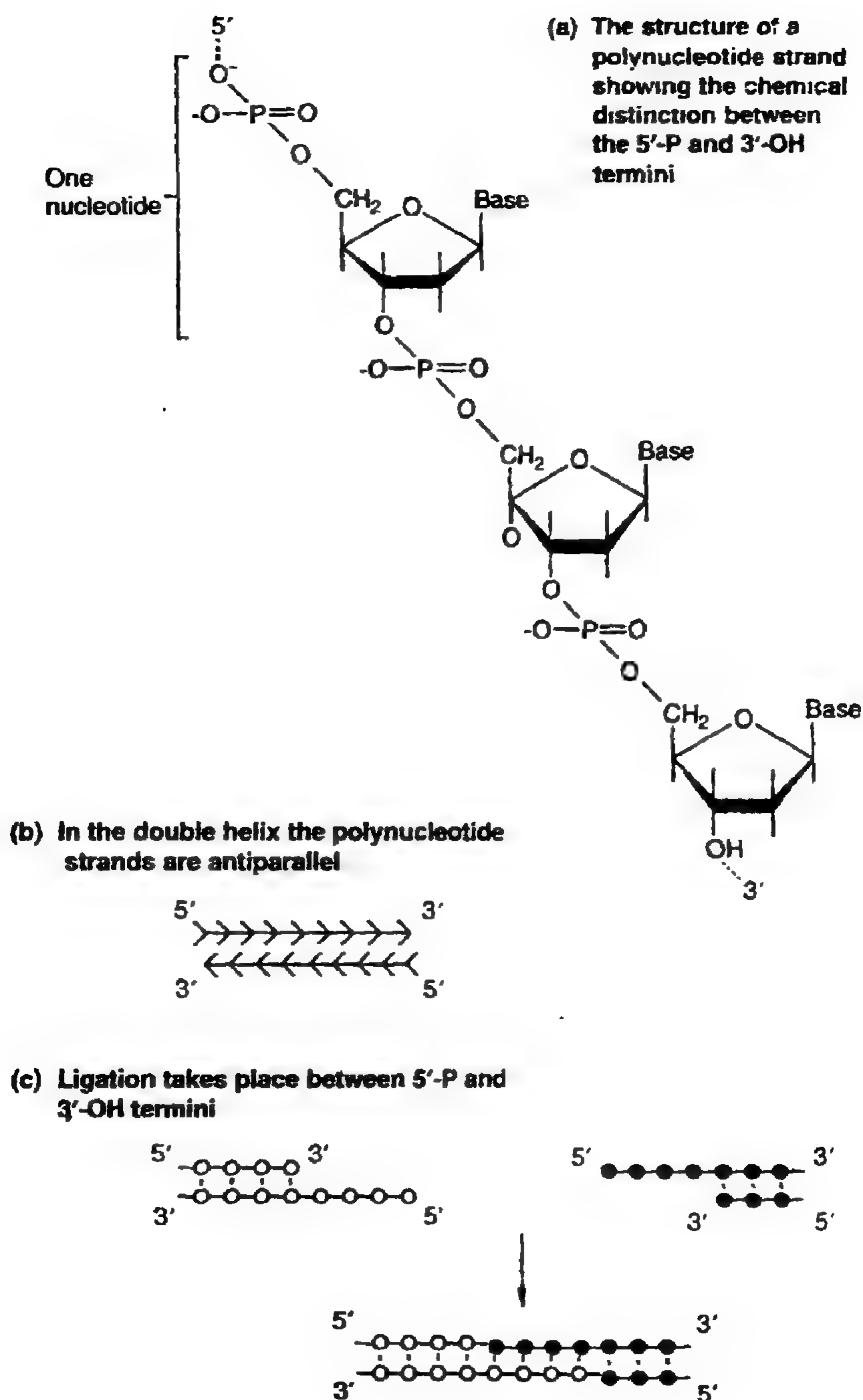
ولكن من عيوب هذه الطريقة أن المأقلمات تلتحم بسهولة جداً من أطرافها اللزجة وبذلك يصبح طرف جزيء دنا عبارة عن طرف مستقيم لأنه يتكون من إلتحام زوج من المأقلمات dimmers ولذلك نحتاج مرة أخرى إلى إنزيمات قطع كما فى حالة الوصلات وهكذا يصبح للمأقلمات نفس عيوب الوصلات.

والإجابة على ذلك تكمن فى معرفة التركيب الكيماوى الدقيق لأطراف جزيء المأقلمات. طرفى جزيء أى شريط عديد النيوكليوتيدات مختلفين طبيعياً، وهذه حقيقة معروفة (شكل ٩٠). حيث أن أحد الطرفين يسمى الطرف 5' أى 5'-terminus وهو يحمل مجموعة فوسفات 5'P والطرف الآخر 3' أى 3'-terminus ذو مجموعة إيدروكسيد 3'-OH. وفى حالة الحلزونين الملتفيم على بعضهما يكونان متقابلين متوافقين ولكنهما يكونان مختلفان فى ترتيب القواعد antiparallel ولذلك فإن كل طرف يتكون من نهاية مجموعة فوسفات 5' أى 5'-P ونهاية أخرى فى نفس الطرف تكون مجموعة OH أى 3'-OH (شكل ٩٠).

المأقلمات يتم تصنيعها أى تخليقها بحيث أن الطرف المستقيم يكون مماثل تماماً للدنا الطبيعى ولكن الطرف اللزج يكون مختلف. النهاية 3'-OH للطرف اللزج تكون كما هى كالمعتاد ولكن الطرف 5'-P يكون محور حيث أنه ينقصه مجموعة فوسفات وهو فى الحقيقة عبارة عن نهاية 5'-P (شكل ٩٢). إنزيم ليجيز دنا يكون غير قادر على تكوين رابطة فوسفورية ثنائية الإستر بين النهاية 5'-OH. ولذلك فإن إلتحام المأقلمات مع بعضها لن يحدث. وهكذا يمكن إلتحام المأقلمات مع جزيء دنا ولكن لا يحدث الإلتحام مطلقاً فيما بينها.

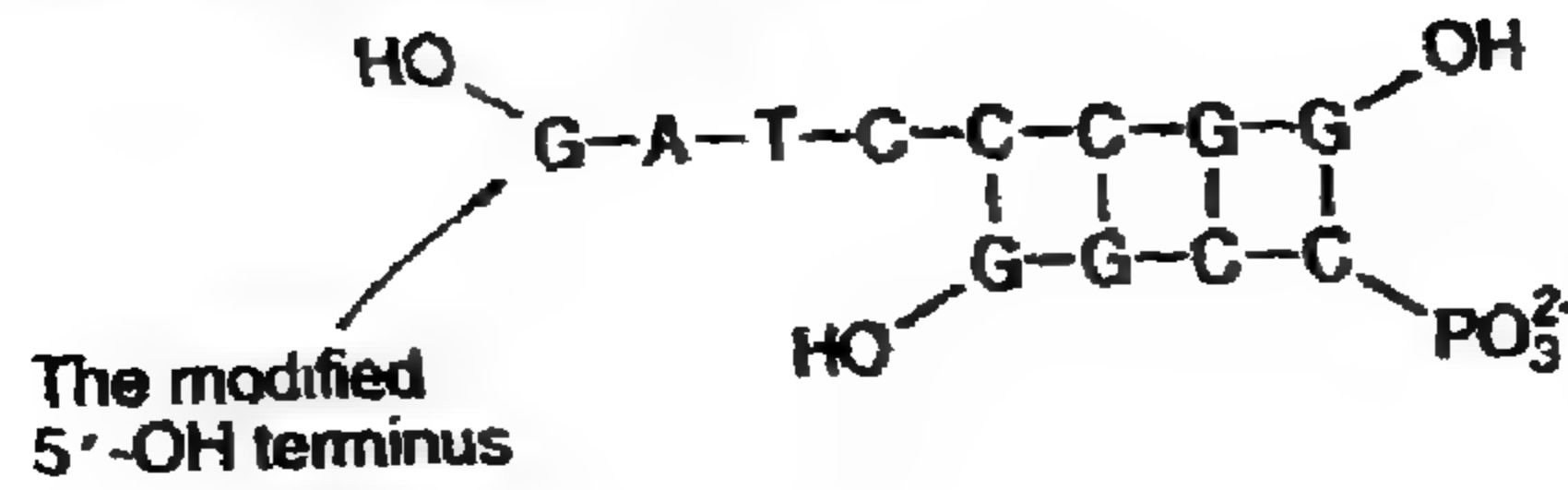
بعد تمام إلتحام المأقلمات مع جزيئات دنا فإن الأطراف الغير طبيعية ذات النهاية 5'-OH يتم تحويلها إلى نهايات عادية نهاية 5'-P ويكون ذلك بواسطة إنزيم polynucleotide kinase وهكذا تنتج أطراف لزجة أى يصبح جزيء دنا عبارة عن شظية ذات طرفين لزجين وهكذا يمكن إدخال هذه الشظية بسهولة فى الناقل الوسيط المتحرك vector.



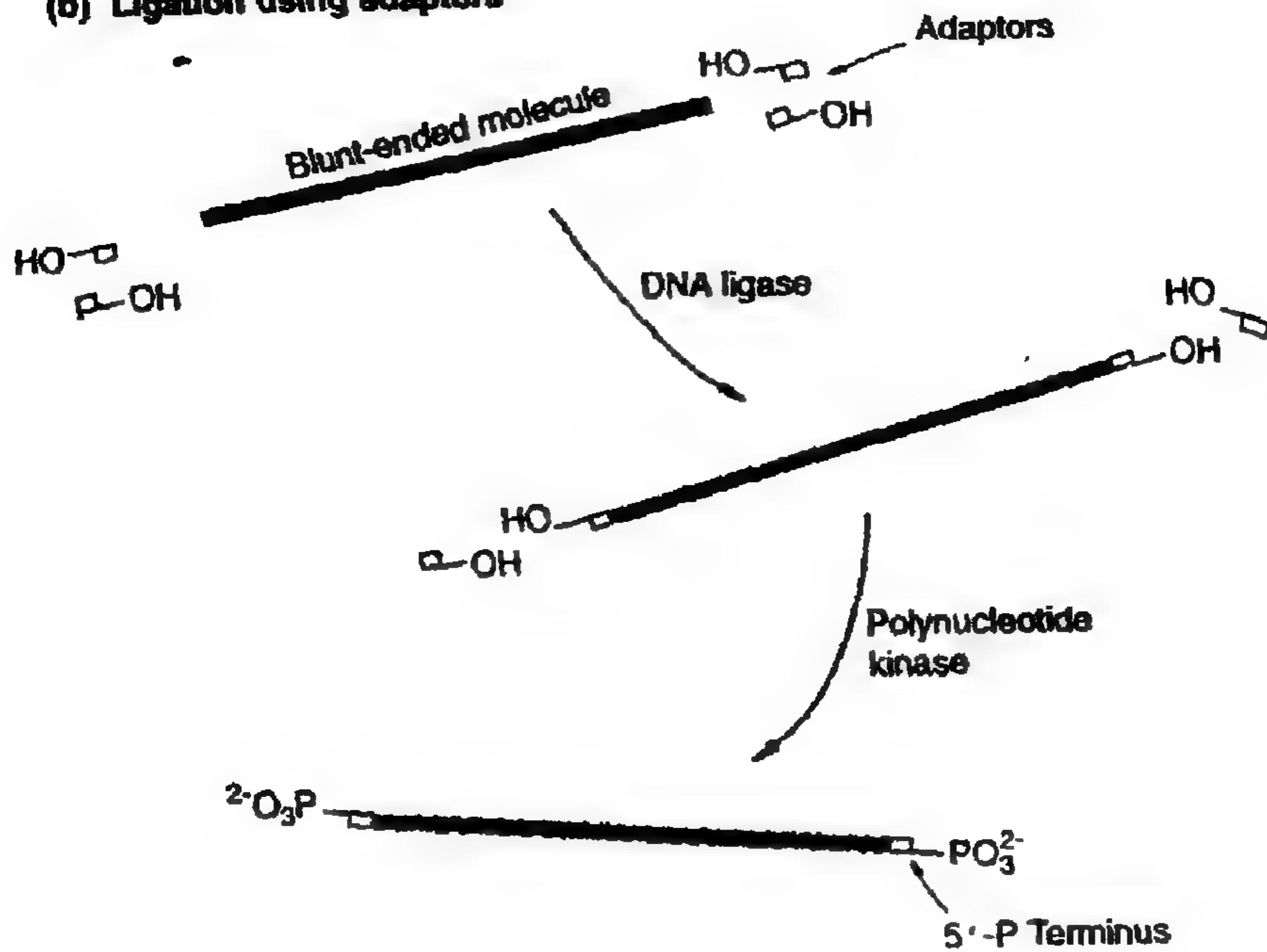


شكل ٩٠: التمييز بين الطرف 5'-P والطرف 3'-OH لجزيء عديد النيوكليوتيدات،  
 (أ) تركيب عديد النيوكليوتيدات يوضح النهاية 5'-P والنهاية 3'-OH، (ب) حلزون دنا  
 antiparallel، (ج) الإلتحام بين الطرف 5'-P والطرف 3'-OH.

(a) The precise structure of an adaptor



(b) Ligation using adaptors



شكل ٩١: استخدام المأقلمات، (أ) تركيب جزئيء لمأقلم، (ب) تحويل الأطراف المستقيمة إلى أطراف لزجة باستخدام المأقلمات.

٣ - تكوين الأطراف اللزجة بواسطة ذيل عديد البلمرات المتجانسة

:Producing sticky ends by homopolymer tailing

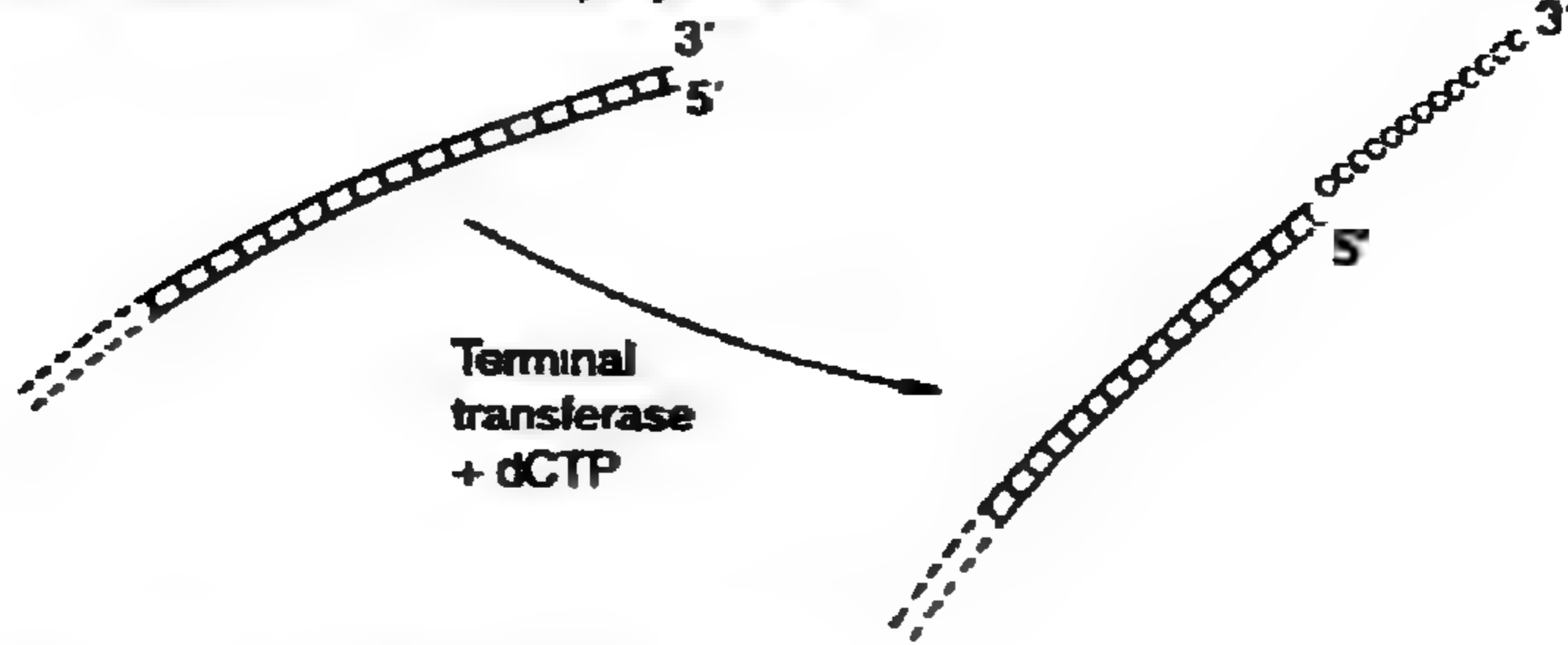
تسمى تكوين الأطراف اللزجة بواسطة ذيل عديد البلمرات المتجانسة باسم طريقة الذيل عديد البلمرات المتجانسة the technique of homopolymer tailing. عديد البلمرات المتجانسة homopolymer عبارة عن عديد البلمرات الذي تكون جميع وحداته متجانسة بإفتراض أن شريط دنا يتكون كلية من قاعدة واحدة مثلاً deoxyguanosine يكون مثال لجزئيء عديد البلمرات المتجانسة ويسمى فى هذه الحالة باسم polydeoxyguanosine أى poly (dG).

تكوين الذيل يحتاج إلى استخدام إنزيم طرفى *deoxynucleotidyl transferase* ليضيف سلسلة من نيوكليوتيد واحد على الطرف 3'-OH لجزيء دنا ثنائى الحلزون. يلاحظ أنه سيضيف السلسلة على طرفى جزيء ثنائى الحلزون لأن كل طرف له نهايتين أحدهما 5'-P والنهاية الأخرى 3'-OH. وهكذا غذا عمل هذا التفاعل السابق فى وجود الإنزيم السابق فى وجود نوع واحد من النيوكليوتيدات فإنه سيتكون الذيل (شكل ٩٢). يمكن إلتحام جزيئين دنا مختلفين ولكل منهما نهايتين ذات ذيل، يجب أن تكون الذيل متوافقة ومثال ذلك شظية لها ذيل جواتين (dG) poly وجزيء دنا آخر عبارة عن ناقل وسيط له ذيل عبارة عن سيتوسين (dC) poly وهكذا فإن ذيل الشظية جواتين سيتزاوج مع ذيل الناقل الوسيط سيتوسين. وهكذا فإن إزدواج وتزاوج القواعد سيحدث بين جواتين وسيتوسين الذيل بين الشظية والناقل المتحرك (شكل ٩٢).

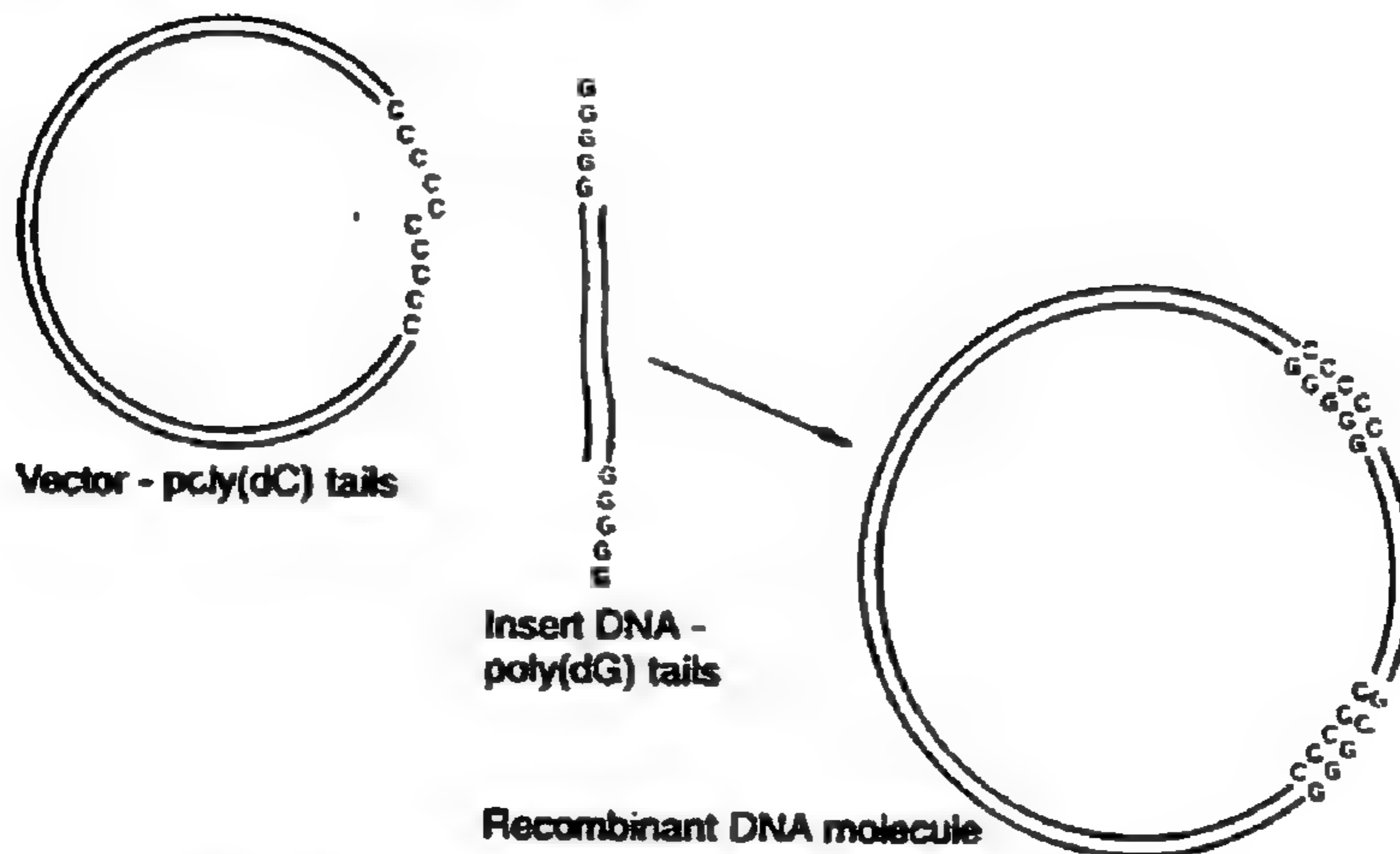
فى الطبيعة ذيل عديد الجواتين عادة لا يكون فى طول ذيل عديد السيتوسين وعند حدوث التزاوج أى الارتباط بين القواعد فإن الجزيئات المرتبطة سيوجد بها فجوات nick وعدم إستمرارية discontinuities فى جزيء دنا (شكل ٩٢). يحدث بعد ذلك إصلاح لملا هذه الفجوات وإصلاح عدم الإستمرارية، ولذلك يكون الإصلاح فى خطوتين وهى استخدام إنزيم بلمرة كлинаو Klenow polymerase لملا الفجوات nicks ثم استخدام إنزيم ليغيز دنا DNA ligase لتخليق الروابط الفوسفورية ثنائية الإستر النهائية the final phosphodiester bonds. هذا الإصلاح لا يحدث دائماً فى أنابيب الاختبار بل يمكن أن يحدث فى خلية العائل أيضاً فى حالة زيادة طول الذيلين المتوافقين عن عشرون نيوكليوتيدة. فى هذه الحالة سيحدث توافق وتزاوج بين الذيلين ويكون هذا التوافق والتزاوج ثابت stable. وهكذا يحدث التوافق والتزاوج الثابت بين الذيلين المتوافقين بين الشظية والناقل المتحرك الوسيط ليكون a recombinant DNA مع عدم حدوث إلتحام كامل not completely ligated ويكون من الثبات الكافى ليمنح إدخاله بعد ذلك فى خلية العائل فى الخطوة التالية. عند دخول هذا a recombinant DNA فى خلية العائل فإن إنزيمات العائل وهى بلمره دنا وليحيز دنا تقوم بإصلاح هذا الـ recombinant DNA ويصبح ملتحم تماماً ومتزاوج

تماماً وهكذا فإن إنزيمات العائل تكمل هذه الخطوات التي بدأت في أنبوبة الاختبار من حيث الإلتحام والتزاوج.

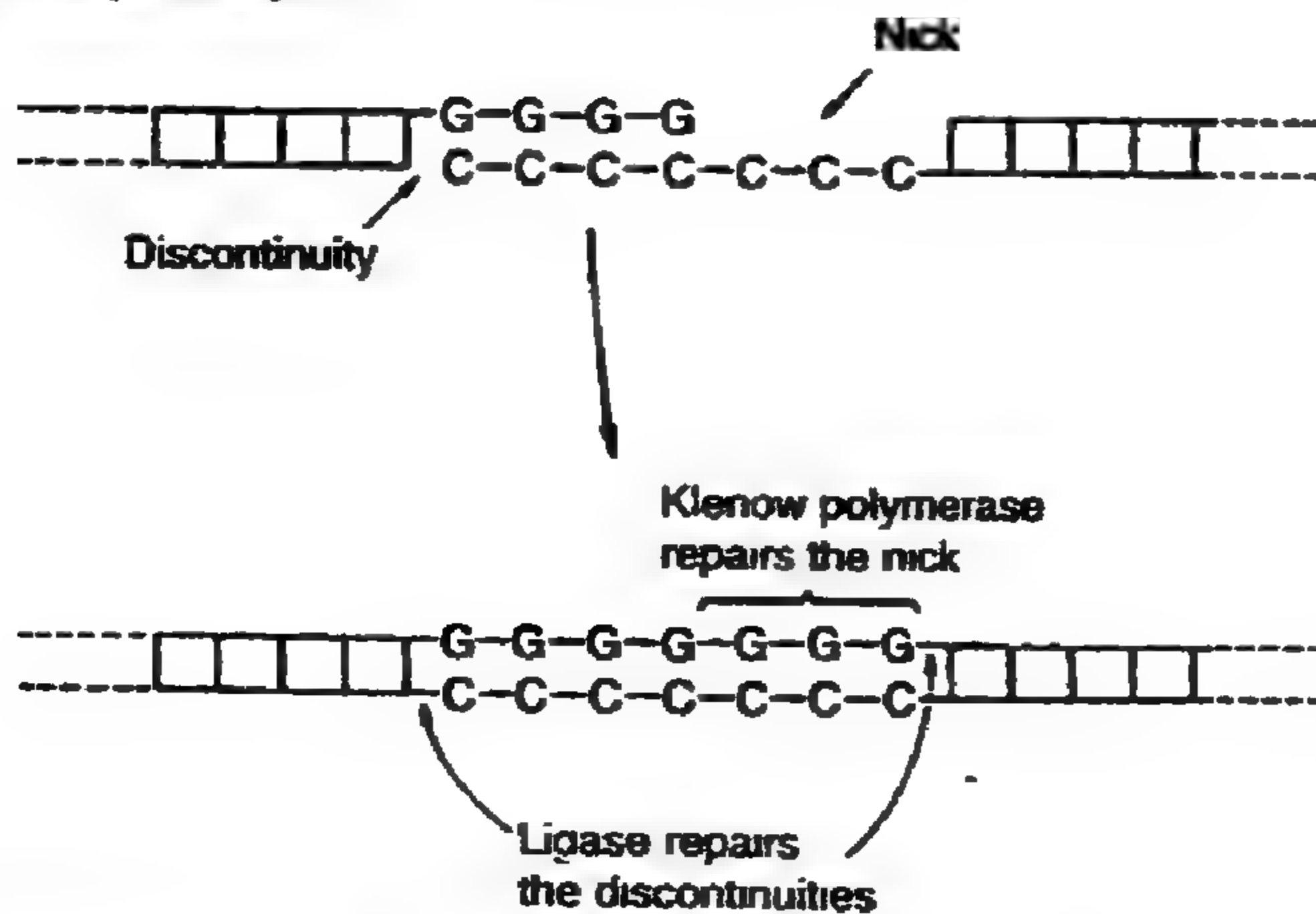
(a) Synthesis of a homopolymer tail



(b) Ligation of homopolymer tails



(c) The repair steps



شكل ٩٢: الذيلول عديدة البلمرات المتجانسة Homopolymer tailing، (أ) تخليق ذيل عديد البلمرات المتجانسة، (ب) تركيب جزئيء recombinant DNA من شظية دنا ذات ذيل وناقل متحرك ذو ذيل tailed vector (مذيل)، (جـ) إصلاح جزئيء recombinant DNA بإنزيم البلمرة كليناو وإنزيم ليجيز دنا.





## **الباب السابع**

# **كيفية اختراق أو إدخال دنا الخلايا الحية**



## كيفية إختراق وإدخال دنا الخلايا الحية

### Introduction of DNA Into Living Cells

بعد تكوين دنا المعاد صياغته كما سبق شرحه فإنه لابد من إدخاله إلى داخل خلية حية وعادة تكوين البكتيريا وقد تكون كائنات حية أخرى. يتم الإحتياج لهذه الخطوة لكي يصبح دنا المعاد صياغته recombinant DNA متوطن داخل الخلية ثم تنقسم هذه الخلايا بسرعة وبالتالي نحصل على وحدات كثيرة من الخلية الحية وقد تكون بأعداد فلكية وبالتالي نحصل على أعداد فلكية من دنا المعاد صياغته بسهولة ويسر وفى فترة زمنية وجيزة وبدون مجهود كبير. ومثال ذلك أنه عند البداية نبدأ بكميات قليلة من دنا المعاد صياغته ولتكن قليل من الناتوجرامات حيث أن الخلية البكتيرية الواحدة تأخذ عادة جزيء دنا واحد معاد صياغته وبعد ذلك تتكاثر البكتيريا ويمكن أن نأخذ من المستعمرة الواحدة عدة ميكروجرامات من دنا المعاد صياغته. إذا تم تنمية البكتيريا على بيئة سائلة فيمكن أن نحصل على عدة ملليجرامات من هذا الدنا المعاد صياغته وبذلك تتضاعف كميته بهذه الطريقة ملايين المرات *mikkkion fold* *increase in yield* وذلك فى فترة وجيزة لا تتعدى أربعة أيام على الأكثر. نحتاج هذه الكميات الكبيرة من دنا أثناء الدراسات على تركيب الجين وأيضاً التعبير عن وظيفته *gene structure and expression*. وما سبق شرحه ميزة لهذه الطريقة.

أما الميزة الثانية لإدخال دنا المعاد صياغته داخل الخلايا الحية مثل البكتيريا أنها تعتبر طريقة من طرق تنقية دنا المعاد صياغته. حيث إنه بإتباع أحدث وأدق طرق التنقية فإن دنا المعاد صياغته يكون ملوث بالشوائب بدرجة معينة ونقل هذه الدرجة باستخدام الطريقة الفائقة الحساسية للتنقية. ونادراً ما يمكن بهذه الطرق الوصول إلى دنا معاد صياغته نقي تماماً غير مختلط مع شوائب. حيث أن المخلوط الناتج من تجارب إعادة الصياغة يحتوى بالإضافة على الجزيء المعاد صياغته المطلوب جزيئات أخرى وهى كما يلى (شكل ٩٣):



١ - حامل أى ناقل وسيط غير ملتحم بشظية من دنا unligated vector molecule.

٢ - شظايا سائبة غير ملتحمة من دنا unligated DNA fragments.

٣ - جزيئات ناقل وسيط أصبحت مغلقة على نفسها على هيئة حلقة بدون إضافة دنا جديد.

Vector molecules that have recircularized without new DNA being inserted (self-ligated vector)

٤ - جزيء دنا معاد صياغته يحمل شظية من دنا غير مرغوبة.

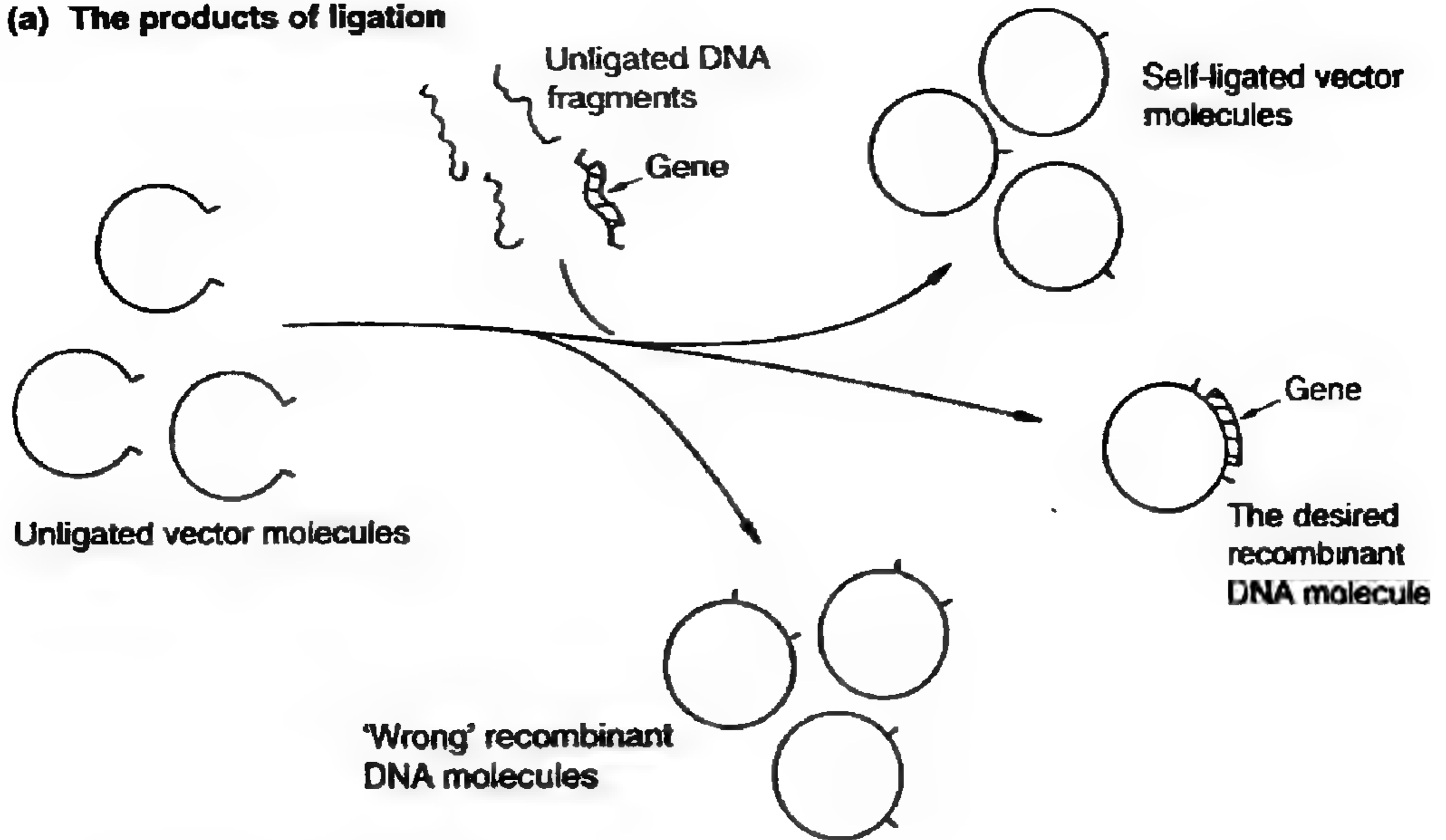
Recombinant DNA molecules that carry the wrong inserted DNA fragment.

فى هذا الباب سيتم شرح كيف أن البلازميد والفاج وجزيئات دنا المعاد صياغتها المشتقة منهما سيتم إدخالها إلى خلايا البكتيريا. كما سيتم شرح الطرق الأخرى المستخدمة فى كيفية إدخال دنا المطلوب أو شظايا دنا المطلوبة إلى داخل خلايا النبات أو الحيوان. عامة أثناء الشرح فى هذا الباب فإن يكون من الواضح أن إنتخاب المستعمرات البكتيرية المحتوية على جزيئات دنا معاد صياغتها من المستعمرات المحتوية self ligatd vector يكون سهل.

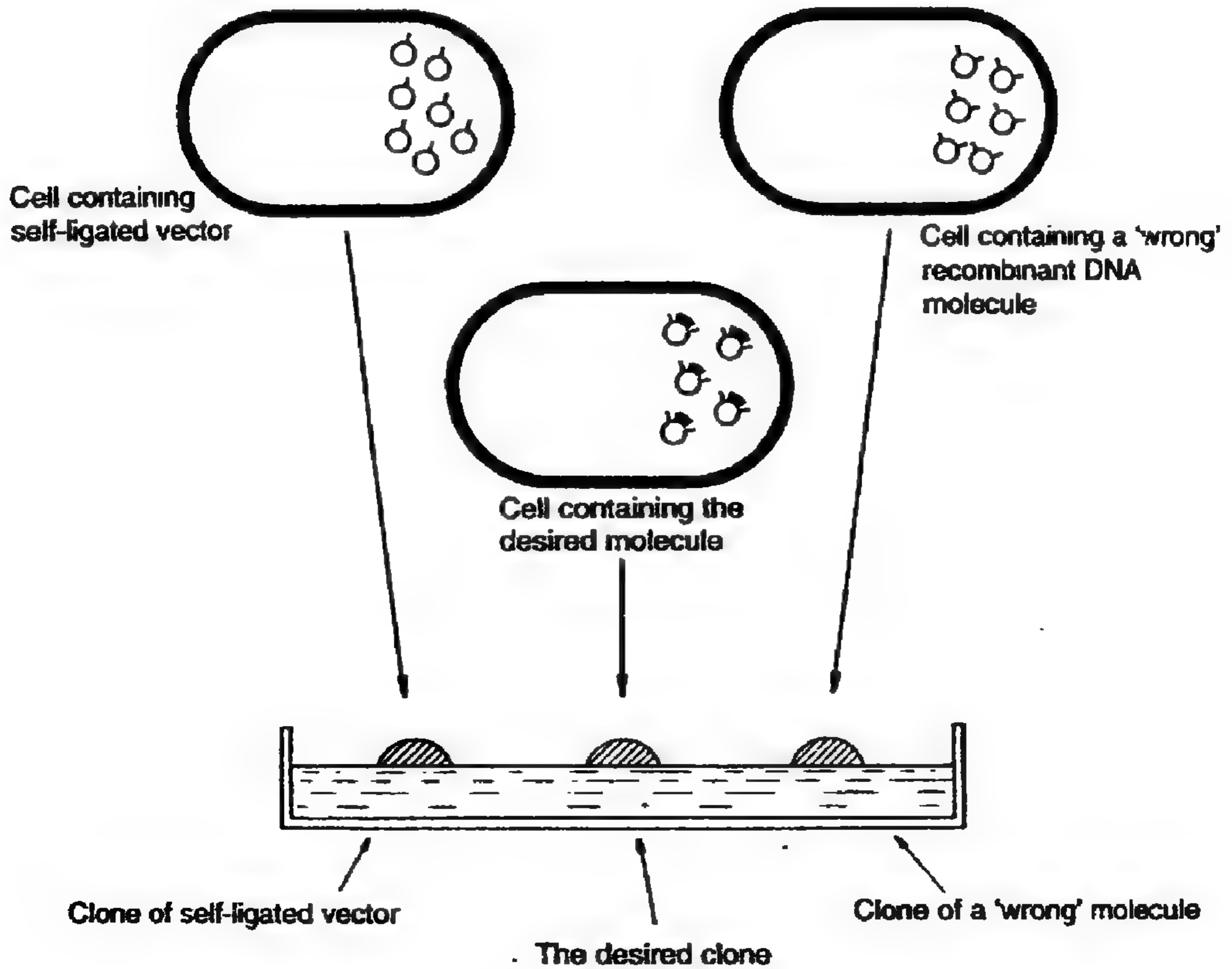
ولكن الأكثر صعوبة من ذلك كيف تميز بين مستعمرات تحتوى على جزيء دنا المعاد صياغته المطلوب ومستعمرات تحتوى جزيء دنا معاد صياغته وغير مطلوب وسيتم شرح ذلك فى باب تال وهو كيف الحصول على clone يحتوى جين معين.

يعتبر التحول (بواسطة البكتيريا) transformation أى أخذ خلية البكتيريا لشظية من دنا من الطرق الهامة لدخول دنا داخل الخلية البكتيرية. كما توجد طريقة أخرى لذلك وهو نقل جزء من دنا خلية بكتيرية إلى خلية بكتيرية أخرى بواسطة الفاج وهذا ما يسمى باسم transduction وفيما يلى شرح مبسط للطرق المذكورة سابقاً.

(a) The products of ligation



(b) All circular molecules will be cloned



شكل ٩٣: المخلوط الناتج من تجارب إعادة الصياغة لدينا.

**التحول البكتيري (أخذ شظية دنا بواسطة خلية البكتيريا)****Transformation – The Uptake of DNA by Bacterial Cells**

أغلب أنواع البكتيريا تكون قادرة على أخذ شظايا دنا من البيئة التي تنمو عليها. عادة جزيء دنا الذي يتم أخذه بهذه الطريقة يتم تحليله ولكن أحياناً يمكن لهذا الجزيء أن يعيش ويتضاعف في خلية البكتيريا. يحدث ذلك على وجه الخصوص لو أن جزيء دنا هو بلازميد وله أصل أو منطقة للتضاعف origin of replication يتم التعرف عليها بواسطة العائل أي خلية البكتيريا.

أخذ دنا وإستقراره وبقاؤه وخاصة إذا كان بلازميد uptake and stable retention a plasmid يمكن التعرف عليه بواسطة الجينات المحمولة على البلازميد والتي يمكن أن تعبر عن نفسها. مثال لذلك حالة البكتيريا *E. coli* كولاى تكون حساسة طبيعياً للتأثير المثبط للنمو المضادات الحيوية مثل الإمبريسيلين والتتراسيكلين. خلايا البكتيريا التي تحتوى البلازميد pBA322 (هذا البلازميد هو أحد البلازميدات الأولى التي إستخدمت كناقل وسيط للتوطين cloning vector فى السبعينيات) تكون مقاومة للمضادين الحيويين السابقين. وذلك لأن هذا البلازميد يحمل مجموعتين من الجينات أحد هذين المجموعتين به جين خاص بتخليق إنزيم بيتا لكتاميز B-lactamase والذي يحور من تركيب الأمبيسيلين إلى مركب غير سام لخلية البكتيريا والمجموعة الثانية من الجينات والتي تكون مسئولة عن تخليق إنزيمات تعادل من سمية التتراسيكلين. وهكذا فإن أخذ خلايا البكتيريا لهذا البلازميد حول transformed هذه الخلايا من البكتيريا *E. coli* كولاى من خلايا حساسة للأمبيسيلين والتتراسيكلين  $amp^s tet^s$  إلى خلايا مقاومة لهما  $amp^R tet^R$ .

وفى هذه الأيام أصبح الإصطلاح transformation عام وشامل ليشمل أخذ شظية أو جزيء بأى نوع من الخلايا الحية سواء بكتيريا أو فطر أو حيوان أو نبات دون النظر أيضاً لأن هذه الجزيء من دنا يسبب تغيرات ملموسة فى الخية أم لا.



فى الطبيعة، لا يعتبر التحول البكتيرى طريقة رئيسية تكتسب بها البكتيريا الصفات. ومما يثبت ذلك أنه فى التجارب المعملية أنواع قليلة فقط من البكتيريا مثل أنواع من الجنس *Bacillus* والجنس *Streptococcus* هى التى يمكن أن يحدث لها تحول بكتيرى بسهولة. والدراسات والمكثفة على هذه البكتيريا أثبتت أنها تمتلك طرق متقدمة رفيعة المستوى sophisticated mechanisms لأخذ وإلتحام وثبات جزيئات دنا الدخيلة DNA binding and uptake.

أغلب أجناس البكتيريا وأنواعها ومنها *E. coli* تأخذ كميات محدودة من دنا فى الظروف الطبيعية. ولكى نستحث هذه الخلايا من البكتيريا وذلك لكى نجعلها قادرة على عمل عملية التحول البكتيرى بكفاءة عالية فلا بد من معاملات خاصة فيزيائية أو كيميائية. والخلايا المعاملة بهذه المعاملات تسمى خلايا competent أى الخلايا المؤهلة أو القادرة أو ذات الكفاءة أو المتنافسة أو التنافسية.

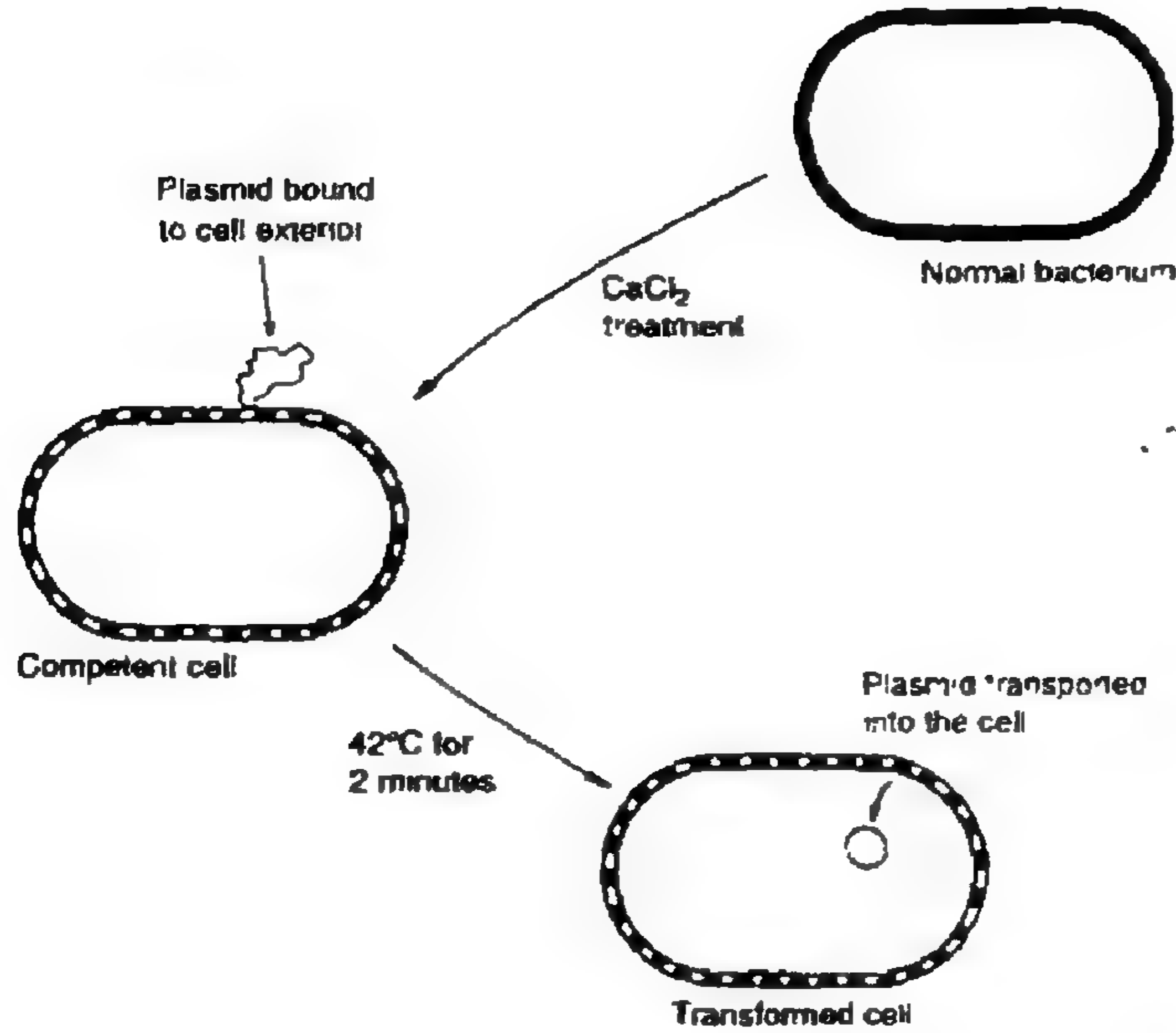
### كيفية تحضير الخلايا المؤهلة أو التنافسية

#### Preparation of Competent *E. coli* cells

ساعد إكتشاف الخلايا المؤهلة أو التنافسية على تقدم وعمل الجزيئات من دنا المعاد صياغتها recombinant DNA technology. وقد تم عمل ذلك فى بداية السبعينيات عندما لوحظ أن خلايا *E. coli* والتى نقعت فى محلول ملهى بارد تلجى ice-cold salt solution قادرة على أخذ دنا من البيئة بكفاءة الية عنه فى حالة الخلايا الغير معاملة. محلول ٥٠ ملليجزيء من كلوريد الكالسيوم يستخدم تقليدياً ولكن أملاح أخرى تستخدم بكفاءة أيضاً مثل كلوريد الروبيديم rubidium chloride. أما عن آلية حدوث ذلك فهو غير معروف. ويوجد إحتمال أن كلوريد الكالسيوم يسبب ترسيب دنا على السطح الخارجى للخلية أو أن هذا الملح مسئول عن بعض التغيير فى تراكيب جدار الخلية والذى يساعد على إلتحام دنا. أى أن النقع فى كلوريد الكالسيوم يؤثر فقط على إلتحام دنا ولا يؤثر على سرعة أو سهولة الدخول الفعلى



لدينا. حيث أنه عند إضافة دنا للخلايا المعاملة فإن دنا يظل ملتصق بالسطح الخارجي لخلية البكتيريا وحتى هذه المرحلة لا يدخل دنا إلى السيتوبلازم. الحركة الحقيقية لدنا إلى داخل الخلايا التنافسية أي الخلايا القادرة يمكن تنشيطه برفع درجة الحرارة إلى ٤٢ درجة مئوية. أما عن آلية عمل هذه المعاملة الحرارية غير معروف (شكل ٩٤).



شكل ٩٤: إلتهام وأخذ دنا بواسطة خلية تنافسية أي خلية قادرة أي خلية قابلة الإستحثاث.

#### إنتخاب الخلايا المتحولة أو المحولة Selection for transformed cell:

تحول الخلايا التنافسية أي الخلايا القادرة طريقة غير فعالة تماماً حتى بالرغم من دقة التحضير لعمل ذلك. بالرغم من أن انانوجرام من  $10^8$  pU يمكن أن ينتج عنه ألف إلى عشرة آلاف حالة تحول transformants فإن هذا مثل أخذ ٠,١% فقط من الجزيئات وأيضاً عشرة آلاف خلية متحولة تكون نسبة ضئيلة جداً من العدد الكلي للخلايا والتي توجد في مزرعة تنافسية. يعني ذلك أن لابد من وجود طريقة فعالة للتمييز بين الخلية التي أخذت بلازميد من آلاف الخلايا الخالية من البلازميد.

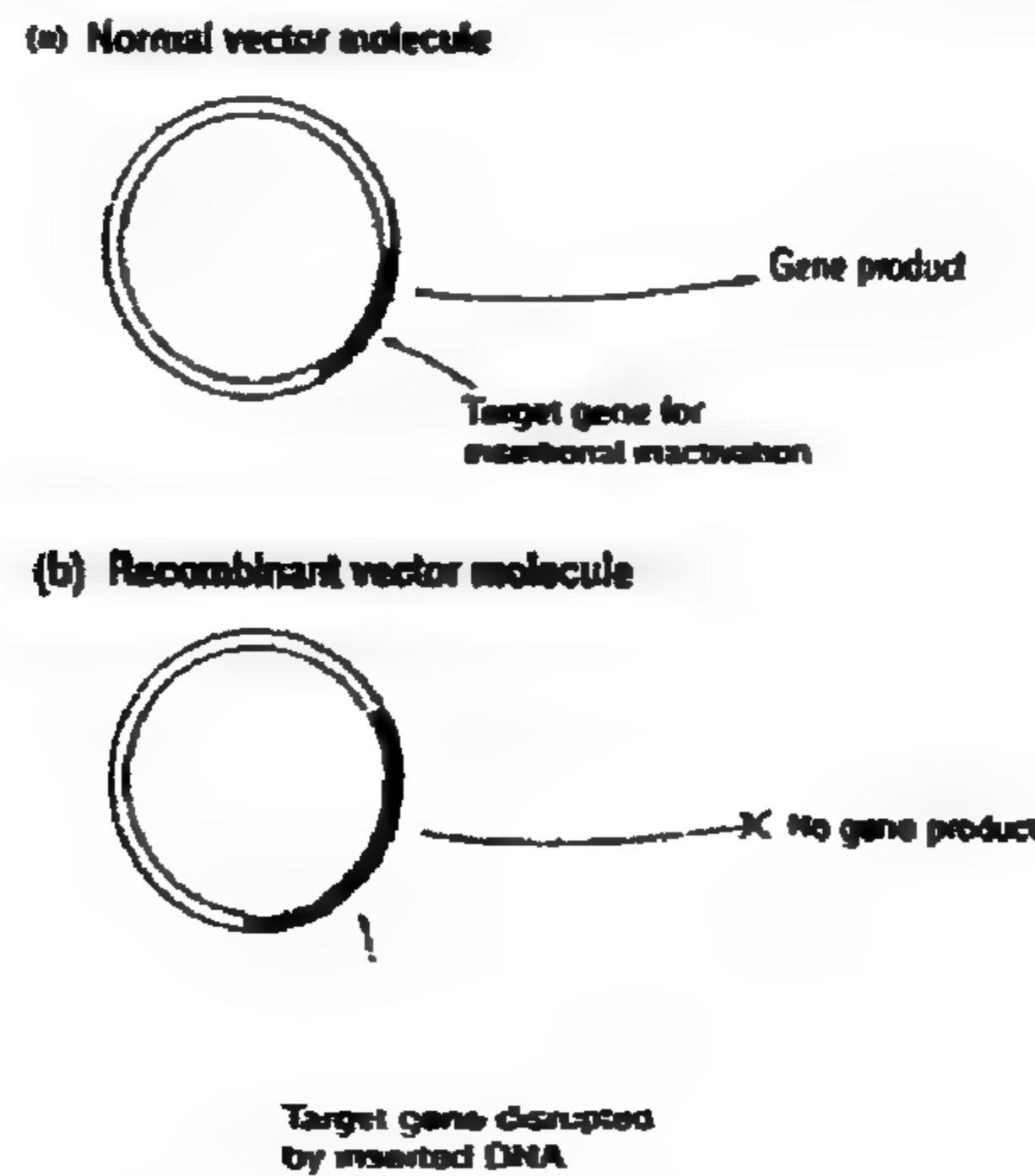
للإجابة على هذا السؤال يجب استخدام معلم منتخب selectable marker محمول بالبلازميد. المعلم المنتخب عبارة عن جين يمد الخلية المحولة بصفة جديدة واضحة مميزة، وأن هذه الصفة لا توجد في الخلايا العادية. ومثال جيد للمعلم المنتخب هو جين المقاومة للأمبسلين في البلازميد pBA322. بعد تجربة تحول بواسطة البلازميد السابق فإن خلايا البكتيريا إ. كولاي التي أخذت هذا البلازميد تصبح هي الوحيدة المقاومة للأمبسلين والتتراسيكلين  $amp^R tet^R$  والتي يمكنها أن تنمو وتتكاثر على بيئة آجار تحتوى إمبسيلين وتتراسيكلين.

وهكذا يمكن التمييز بين الخلايا المحولة والخلايا الغير محولة، حيث أن الأخيرة لن تنمو على البيئة السابقة. عامة أغلب البلازميدات المستخدمة كناقلات وسيطة تحمل على الأقل جين لمقاومة إحدى المضادات الحيوية وهكذا يمكن عمل إنتخاب للخلايا المتحولة بتميمتها على بيئة آجار تحتوى المضاد الحيوى تحت الدراسة. هذه المقاومة للمضاد الحيوى لا تحدث في التو ومباشرة بعد دخوله البلازميد إلى داخل خلية البكتيريا حيث أن البلازميد يحدث تأثيره نتيجة لإظهار صفة الجين والذي يخلق الإنزيم اللازم لتحليل أو معادلة المضاد الحيوى. عامة تعبير الجين عن وظيفته يحدث مباشرة بعد عملية التحول ولكنه يحتاج إلى زمن عبارة عن بضع دقائق لكي يكون الجين قادر على تخليق كمية كافية من الإنزيم قادرة على مقاومة التأثير الضار للمضاد الحيوى. ولهذا السبب فإن الخلايا المحولة لا تزرع مباشرة على بيئة الآجار الإنتخابية بعد المعاملة الحرارية ولكن أولاً توضع في كمية قليلة أي حجم قليل من بيئة سائلة في غياب المضاج الحيوى ويتم تحضينها على هذا الوضع في حضان ٣٧ مئوية لمدة ساعة. وهكذا فإن تكاثر أي تضاعف البلازميد والتعبير عن صفاته تكون قد بدأت وتكون قد خلقت كميات كافية من الإنزيمات اللازمة لإستمرار حياة البكتيريا بعد زرعها بعد ذلك على بيئة آجار إنتخابية محتوية على المضاد الحيوى. بيئة الآجار تحتوى على ميكروجرام إمبسيلين لكل لتر، ١٥ ميكروجرام تتراسيكلين لكل لتر.

## التعرف على الخلايا المعاد صياغتها

## Identification of Recombinants

الزراعة plating أى تنمية خلايا البكتيريا على بيئة إنتخابية تمكن الباحث من التمييز بين الخلايا المعاد صياغتها والخلايا العادية. والمشكلة هنا فى الحالة هو كيفية التمييز بين المستعمرات المحتوية على خلايا معاد صياغتها والمستعمرات المحتوية على خلايا تحتوى على الناقل الوسيط المتحرك دون الشظية المطلوبة self-ligated vector molecules. فى الغالبية العظمى من الناقلات الوسيطة المتحركة ومثال ذلك فإن إدخال شظية دنا مثلاً فى البلازميد تفسد أحد الجينات الموجودة على الجزيء destroys the integrity of one gene وهكذا يمكن التعرف على الخلايا المعاد صياغتها بالقاعدة السابقة حيث أن دخول الشظية المراد نقلها تفسد أحد الجينات المدروسة وهكذا لا يقوم هذا الجين بدوره فى الخلية الحية وهكذا يمكن التعرف على هذه الخلايا حيث أنها تحتوى على جين فاسد أو خامل ولا يؤدي وظيفته المعروفة للباحث. هذه الحالة تسمى التثبيط التداخلى insertional inactivation (شكل ٩٥) وسيتم شرحها بالتفصيل على الناقل الوسيط المتحرك البلازميد pBA322.



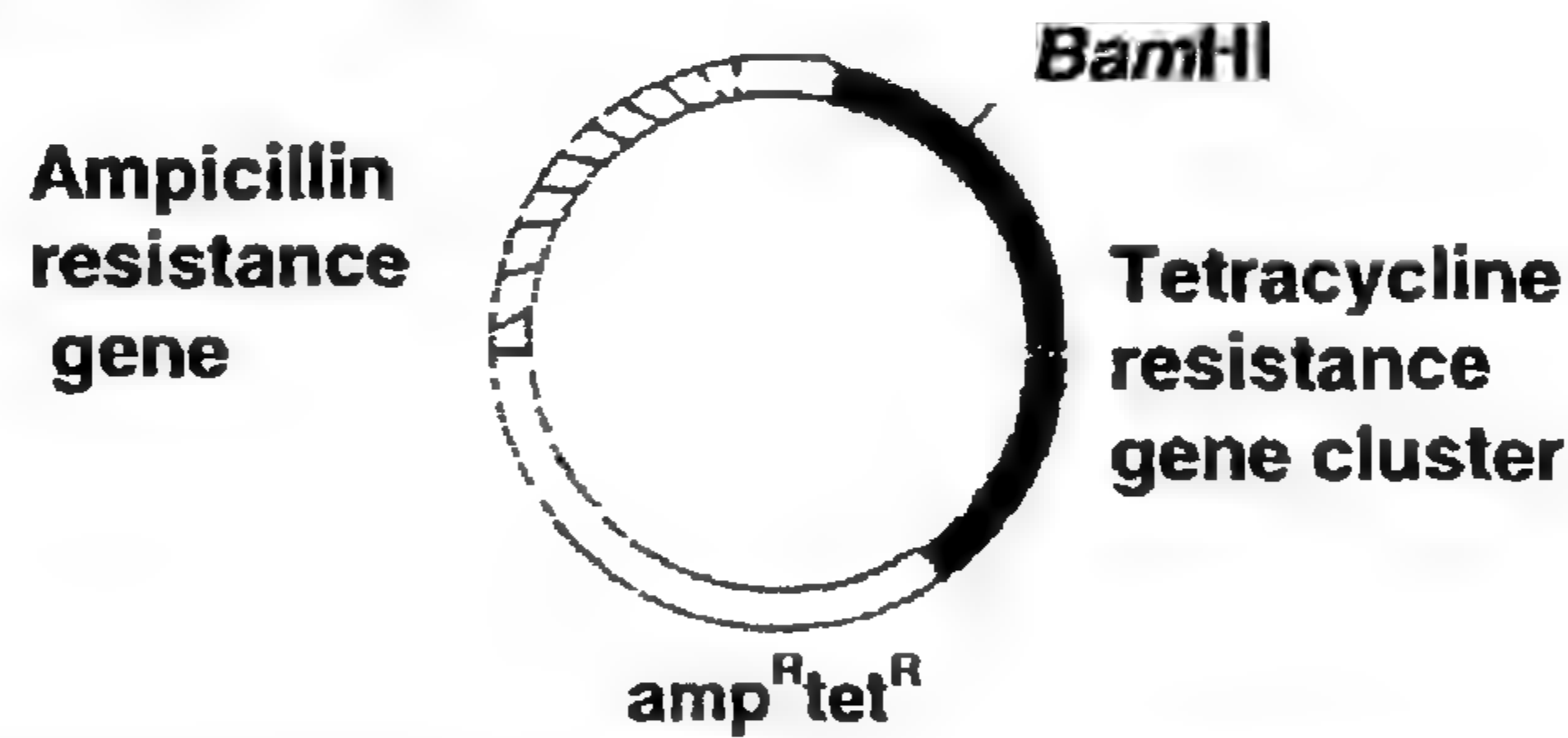
شكل ٩٥: (a) بلازميد عادى به جين مدروس وظيفته بالتفصيل وسيتم إفساده أو تثبيطه، (b) بلازميد به تثبيط تداخلى للجين تحت الدراسة ولا يقوم بعمله ولا يكون الناتج.

## انتخاب الخلايا المعاد صياغتها في حالة البلازميد pBA322

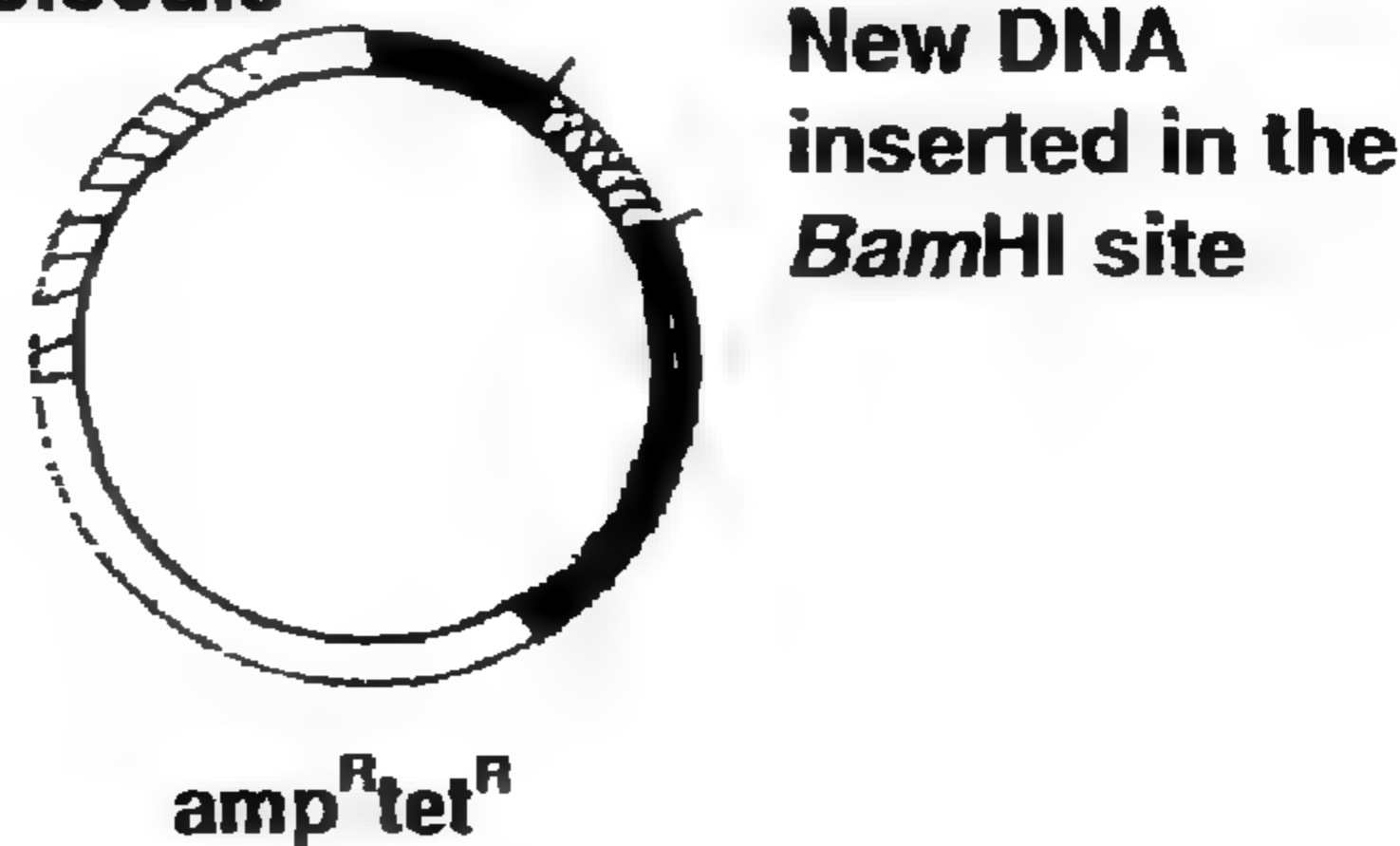
### Recombinant selection with pBA322

يحتوى البلازميد pBA322 على عدد من أماكن القطع المحدد الفريدة unique restriction sites والتي تستخدم في شق أى فتح البلازميد قبل إدخال شظية دنا المطلوب دراستها أو المطلوبة. ومثال ذلك فإن إنزيم القطع المحدد *Bam* HI يقطع البلازميد في موقع واحد محدد معين في داخل عنقود من الجينات (مجموعة من الجينات) cluster of genes والتي تكون مسئولة عن المقاومة لمركبات التتراسيكلين. ولذلك فإن البلازميد المعاد صياغته أى الذى يحتوى شظية إضافية من دنا في الموقع *Bam* HI (شكل ٩٦) يصبح غير قادر على جعل خلية البكتيريا مقاومة للتتراسيكلين، وهكذا تم فساد الجين وتنشيطه بواسطة التنشيط التداخلي insertional inactivation وهكذا تصبح خلايا البكتيريا المحتوية على البلازميد المعاد صياغته حساسة للتتراسيكلين ومقاومة للإمبيسيلين ( $amp^R tet^S$ ).

(a) The normal vector molecule



(b) A recombinant pBR322 molecule



شكل ٩٦: (a) بلازميد pBA322 عادى، (b) البلازميد معاد صياغته ويحتوى شظية من دنا تثبط عمل جينات التتراسيكلين.



أما عن كيفية تحديد موقع مستعمرات البكتيريا المحتوية على خلايا معاد صياغتها وتحتوى الظية المطلوب نقلها كالتالى. بعد عمل التجربة السابقة فإنه يتم زراعة ناتج التجربة السابقة على بيئة آجار بها إمبسيلين وتترك فى الحضان مدة مناسبة وهكذا فإن المستعمرات النامية على هذه البيئة تكون جميعها مقاومة للإمبسيلين وتكون جميعها معاد صياغتها، وبالطبع الخلايا الحساسة للإمبسيلين لن تنمو (الخلايا العادية تكون حساسة للإمبسيلين أيضاً أما تحولها إلى خلايا مقاومة للإمبسيلين دليل أنها إكتسبت البلازميد). هذه الخلايا النامية المعاد صياغتها قليل منها يحتوى على البلازميد المعاد صياغته والغالبية العظمى منها احتوى على البلازميد العادى self ligated plasmid. والتعرف على المستعمرات المتكونة من خلايا معاد صياغتها تستخدم طريقة replica plating method. يمكن شرح هذه الطريقة باختصار.

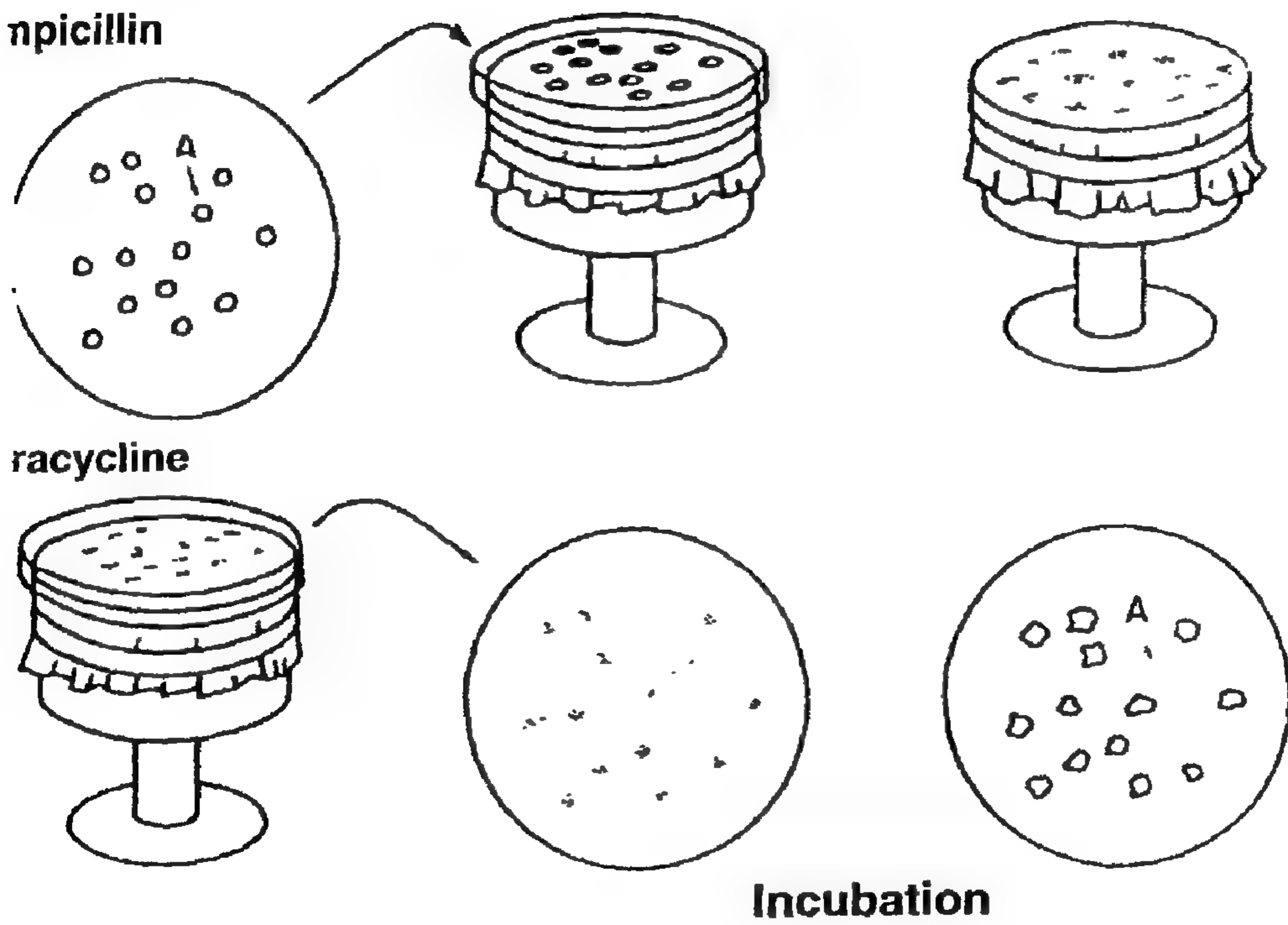
- يوضع على المستعمرات النامية فى بيئة الآجار ذات الإمبسيلين قماش قطيفة معقم وهذا القماش القطيفة يوجد على support يد معدنية أو خشبية أو على قمتها يوجد قرص معدنى أو خشبى.

- يتم تثبيت أى ربط القطيفة على القرص وهكذا يتم عمل التلامس بين القطيفة وسطح المستعمرات البكتيرية. وهكذا تترك كل مستعمرة بصمة لها على القطيفة وتوضح موقعها فى طبق بترى (شكل ٩٧).

- التلامس أى حك القطيفة على المستعمرات البكتيرية يكون برقة gently وكذلك بالنسبة للفطريات، أما فى حالة streptomycetes يكون الحك شديد hard. وهكذا بعد ذلك فإن هذا الطبق بترى يوضع فى الثلاجة. ثم على بيئة آجار فى طبق بترى آخر محتوية على التتراسيكلين يتم حك القطيفة على سطح البيئة.

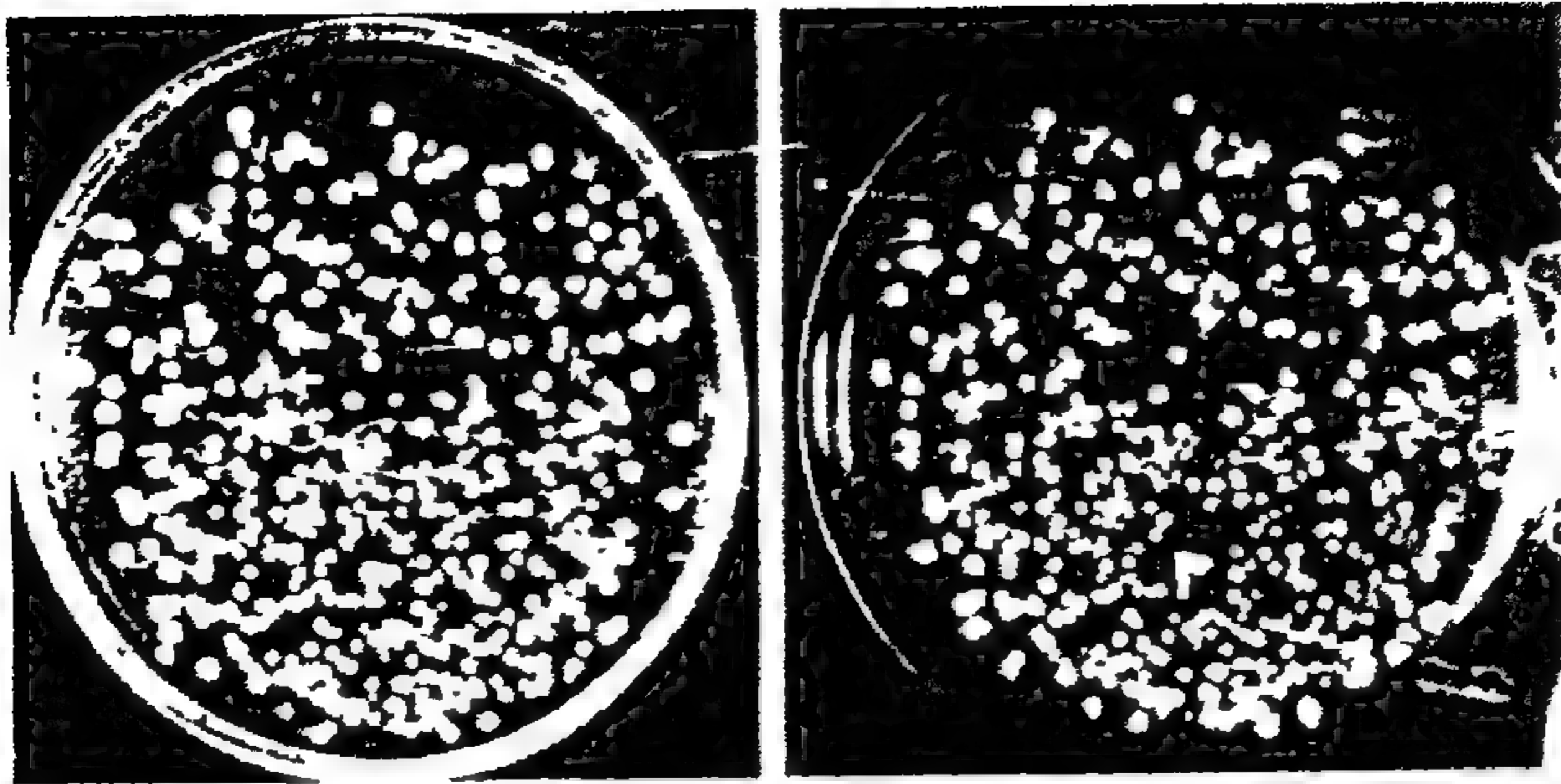
- ثم يأخذ الطبق أو الأطباق وتوضع فى الحضان وبعد فترة مناسبة حوالى ٣-٧

أيام يتم فحص الطبق وملاحظة المستعمرات النامية ومقارنة موقع المستعمرات النامية بموقع المستعمرات النامية في بية الإمبسيلين في الطبق بعد إخراجها من الثلاجة. فإن الأماكن الخلية من المستعمرات في الطبق الثاني وتحتوى على مستعمرات في الطبق الأول، تكون هذه المستعمرات في الطبق الأول هي المكونة من خلايا معاد صياغتها والمطلوبة (شكل ٩٧). وهكذا يمكن تطبيق هذه الطريقة في هذه الحالة وفي حالات الطفرات الأخرى للبكتيريا والفطريات المختلفة.

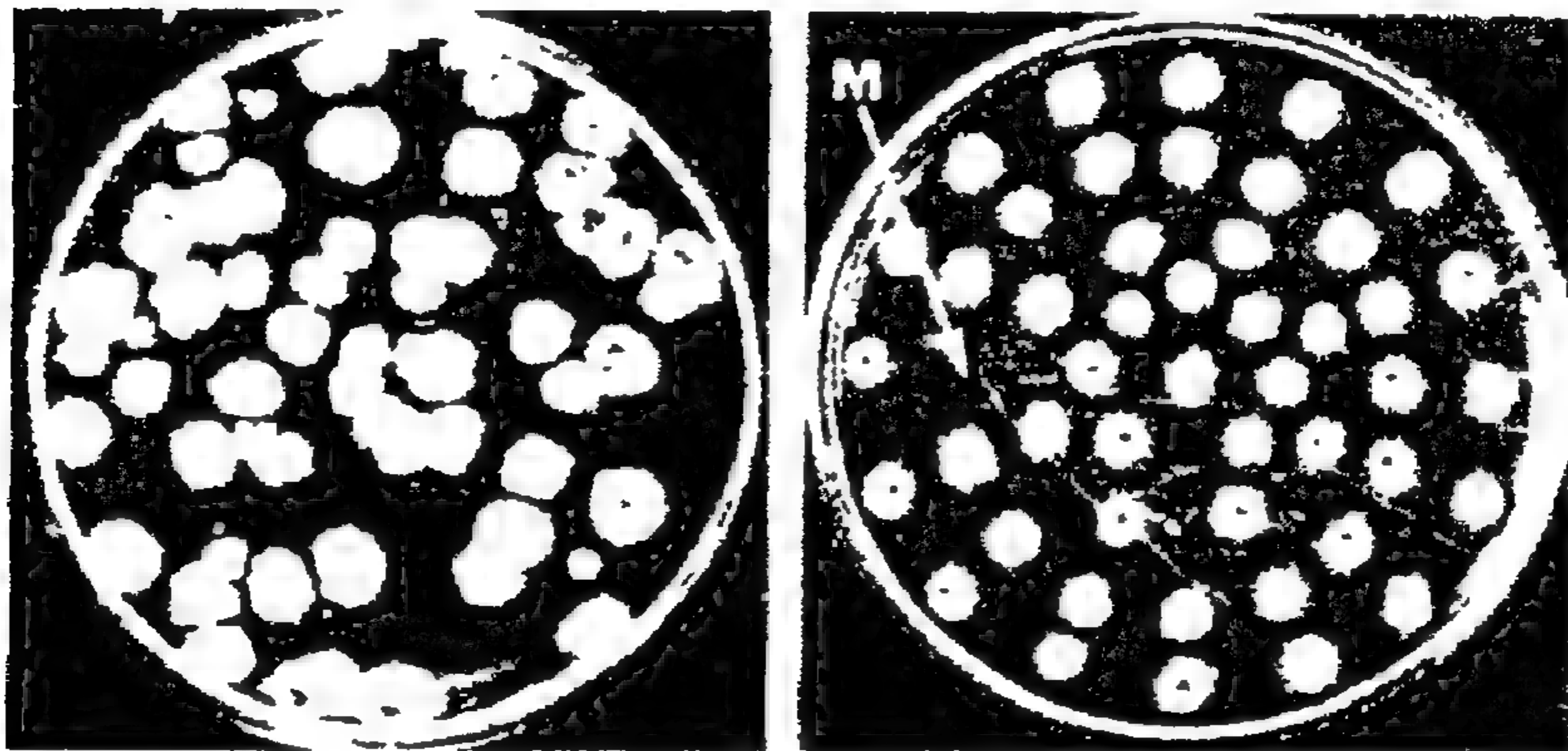


شكل ٩٧: طريقة replica plating.

وتستخدم هذه الطريقة بكثرة للتعرف وتحديد الطفرات في الكائنات الحية الحقيقية مثل البكتيريا (شكل ٩٨) والفطريات (شكل ٩٩).



شكل ٩٨: مستعمرات بكتيرية نامية على بيئة آجار وتم استخدام طريقة replica plating تشير الأسهم إلى موقع المستعمرات البكتيرية المطلوبة وهي المعاد صياغتها أو المتطفرة في حالة دراسة الطفرات.

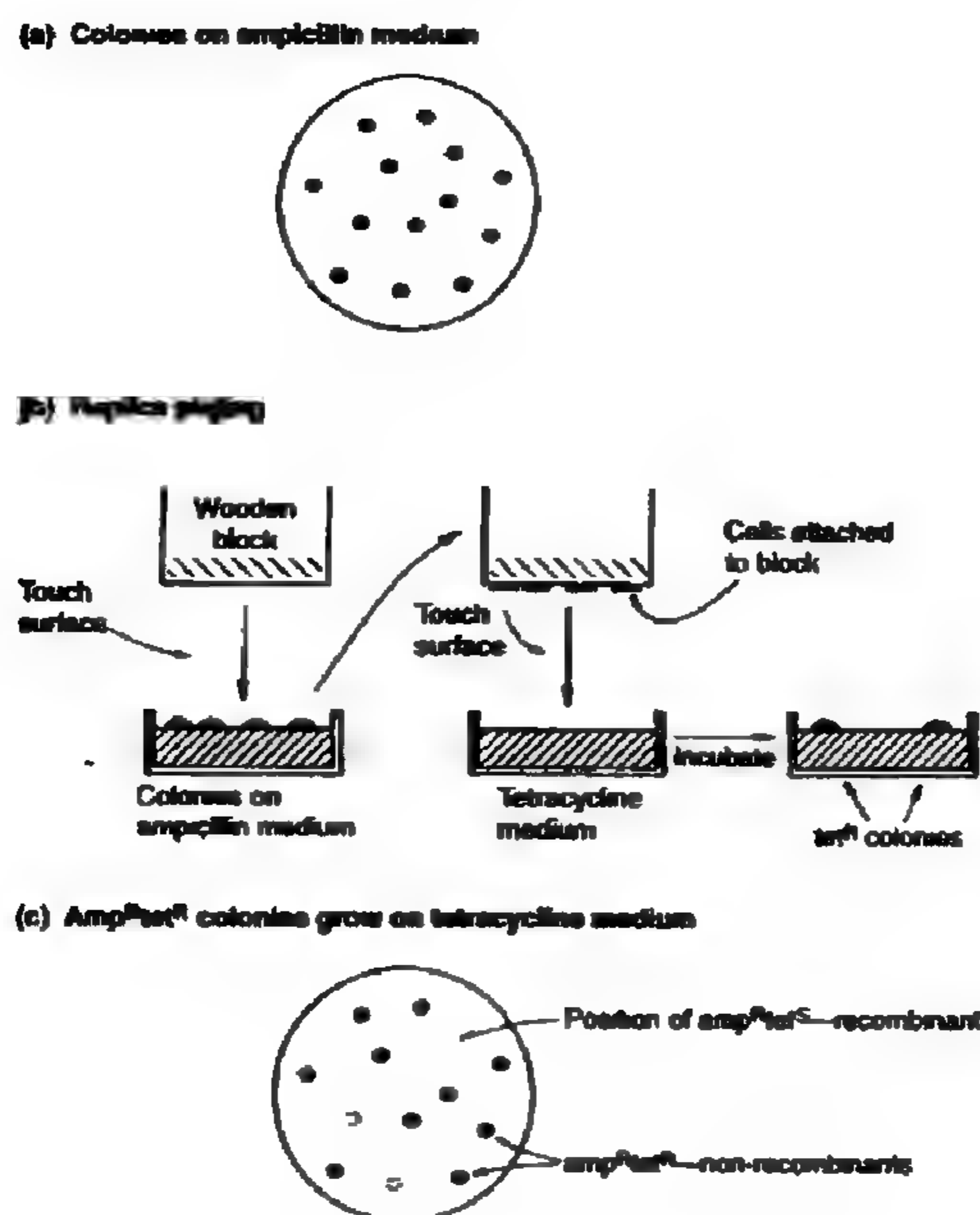


شكل ٩٩: مستعمرات فطر *Aspergillus nidulans* نامية على بيئة آجار وتم استخدام طريقة replica plating يشير السهم إلى موقع المستعمرة الطفرة.

وهكذا يتم استخدام نفس البيئة مرتين وبها مركب مختلف مرة واحدة في طبقتين مختلفين ولذلك سميت زراعة مستعمرات البكتيريا أو الفطر المكررة وهو شرح المصطلح الإنجليزي replice plating أى الزراعة (التنمية) المكررة. وهكذا في حالة التجربة الخاصة بهذا الجزء فغن المستعمرات الحساسة للتتراسيكلين أى المحتوية على بلازميدات معاد صياغتها المطلوبة لا تنمو على بيئة التتراسيكلين ويمكن تحديد



موقعها بهذه الطريقة في بيئة الإمبسيلين. أما المستعمرات النامية على طبق بيئة التتراسيكلين تحتوي على بلازميد pBA322 عادى أى لم يعاد صياغته فى المكان المطلوب (شكل ١٠٠).



شكل ١٠٠: تحديد موقع مستعمرات البكتيريا المكونة من خلايا محتوية على البلازميد المعاد صياغته بإدخال الشظية المطلوبة والتي سببت تثبيط جين المقاومة للتتراسيكلين باستخدام طريقة replica plating.

### التثبيط التداخلى فى حالات غير المقاومة للمضادات الحيوية

**Insertional inactivation does not always involve antibiotic resistance:**

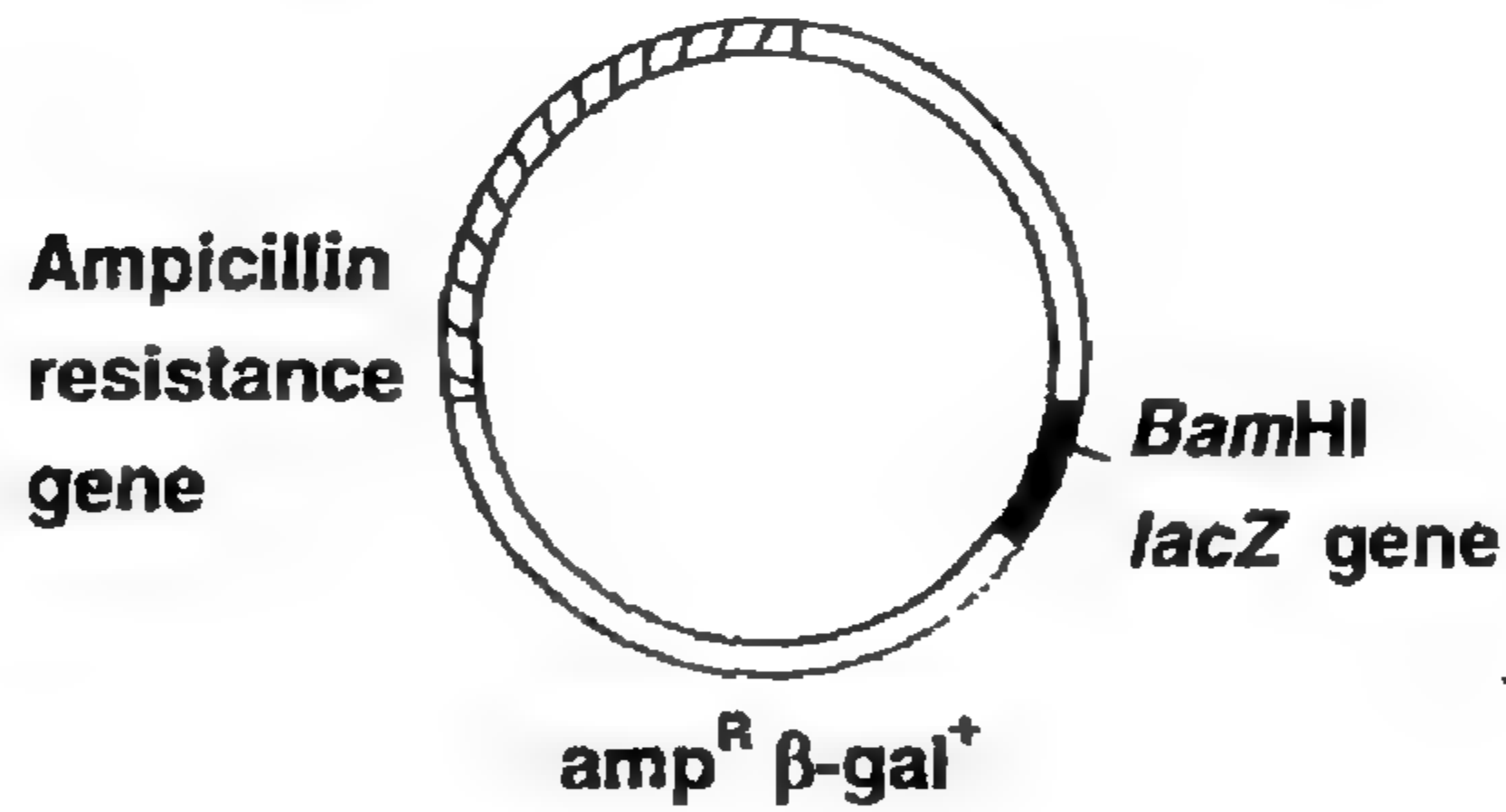
بالرغم من أن التثبيط التداخلى (التداخل والتثبيط) لجينات المقاومة للمضادات الحيوية تعتبر طريقة هامة وفعالة وعملية للتعرف على الخلايا الماعد صياغتها فإنه توجد حالات أخرى للبلازميدات المستخدمة كناقل وسيط متحرك plasmid cloning vectors تستخدم حالات وأنزمة أخرى خلاف المقاومة للمضادات الحيوية. ومثال ذلك البلازميد pUC8 (شكل ١٠١) والذي يحمل جين المقاومة للإمبسيلين وجين آخر



يسمى lac Z' وهذا الجين الأخير مسئول عن تخليق جزء من الإنزيم بيتا جالاكتوسيديز. التوطين بالبلازميد pUC8 أى إدخاله لخلية البكتيريا وبه تثبيط تداخل (التداخل والتثبيط) للجين lac Z' يمكن التعرف على حدوث التثبيط التداخلى فى هذه الحالة لأن خلايا البكتيريا الموطن فيها هذا البلازميد تكون غير قادرة على تخليق إنزيم بيتا جالاكتوسيديز (شكل ١٠١).

يعتبر بيتا جالاكتوسيديز واحد من سلسلة الإنزيمات المسئولة عن تحليل سكر اللاكتوز إلى جلوكوز وجالاكتوز. الجين المسئول عن تخليق هذا الإنزيم يوجد طبيعياً فى الطبيعية فى كروموسوم البكتيريا إ. كولاى ويسمى lac Z. وبعض سلالات البكتيريا لها جين محور من lac Z ينقصه جزء يسمى lac Z وهذا الجزء الناقص مسئول عن تخليق الجزء ألفا ببتيد  $\alpha$ -peptide protion لهذا الإنزيم (شكل ١٠٢). الطفرات، أى خلايا البكتيريا المتطفرة أى خلايا السلالات الأخيرة المحتوية على هذا البلازميد هى الوحيدة القادرة على تخليق هذا الإنزيم لأنها تحتوى الجزء الناقص من الجين وهو الشظية lac Z' والذي يوجد فى البلازميد pUC8.

(a) pUC8



(b) A recombinant pUC7 molecule



شكل ١٠١: البلازميد pUC8 والذي يستخدم كناقل وسيط متحرك، (a) بلازميد عادى، (b) بلازميد معاد صياغته يحتوى شظية من دنا إضافية متداخلة فى الموقع BamHI.

وهكذا فإن تجربة التوطين بهذا البلازميد pUC8 يمكن عملها ثم يتم الكشف على الخلايا الطفرة المعاد صياغتها وذلك بزراعتها (تنميتها) على بيئة آجار محتوية أمبسيلين ثم بعد ذلك زراعة المستعمرات الناتجة على بيئة آجار بها مصدر كربون عبارة عن سكر اللاكتوز. المستعمرات التي تنمو على هذه البيئة تكون هي المستعمرات المطلوبة أى المكونة من خلايا معاد صياغتها، لأن هذه الخلايا هي الوحيدة القادرة على تحليل اللاكتوز وإستخدام الجلوكوز واللاكتوز كمصدر للكربون ولا يتم ذلك إلا فى وجود إنزيم بيتا جالاكتوسيديز. ولكن يوجد خلايا أخرى معاد صياغتها تقاوم الأمبسيلين  $amp^R$  ولكنها تكون غير قادرة على تحليل اللاكتوز  $\beta$ -gal<sup>-</sup> (شكل ١٠٢). عامة الكشف عن بيتا حلاكتوسيديز سهل سواء وجوده أو غيابه. عامة من السهل عمل الطريقة السابقة ولكن توجد أيضاً طريقة أخرى سهلة لونية. حيث يوضع فى البيئة مشابه لللاكتوز lactose analogue يسمى X-gal وتركيبه 5-bromo-4-chloro-3-indoly-B-glactopyranoside والذي يتحلل بواسطة بيتا جالاكتوسيديز ليكون ناتج تفاعل ذو لون أزرق غامق. لو أن X-gal مضاف للآجار (مضاف أيضاً مركب inducer للإنزيم مثل isopropyl-thiogalactoside وإختصاره IPTG) وأيضاً يضاف إمبسيلين فإن الخلايا العادية الطبيعية الغير معاد صياغتها تكون قادرة على تخليق الإنزيم وتحليل اللاكتوز أو X-gal وتصبح ملونة باللون الأزرق الغامق بينما الخلايا المعاد صياغتها وفيها تثبيط وفساد للجين lac Z' تكون غير قادرة على تخليق الإنزيم وهكذا تكون المستعمرات بيضاء. هذه الطريقة تسمى Lac selection وملخصه فى الشكل (شكل ١٠٢).

### **إدخال دنا الفاج فى خلايا البكتيريا**

#### **Introduction of DNA Into Bacterial Cells:**

توجد ثلاثة طرق مختلفة يمكن بها تكوين دنا معاد صياغته بواسطة الفاج كناقل وسيط متحرك حيث أن الفاج يسهل عليه إختراق خلية البكتيريا طبيعياً يحدث ذلك بالطرق الآتية:

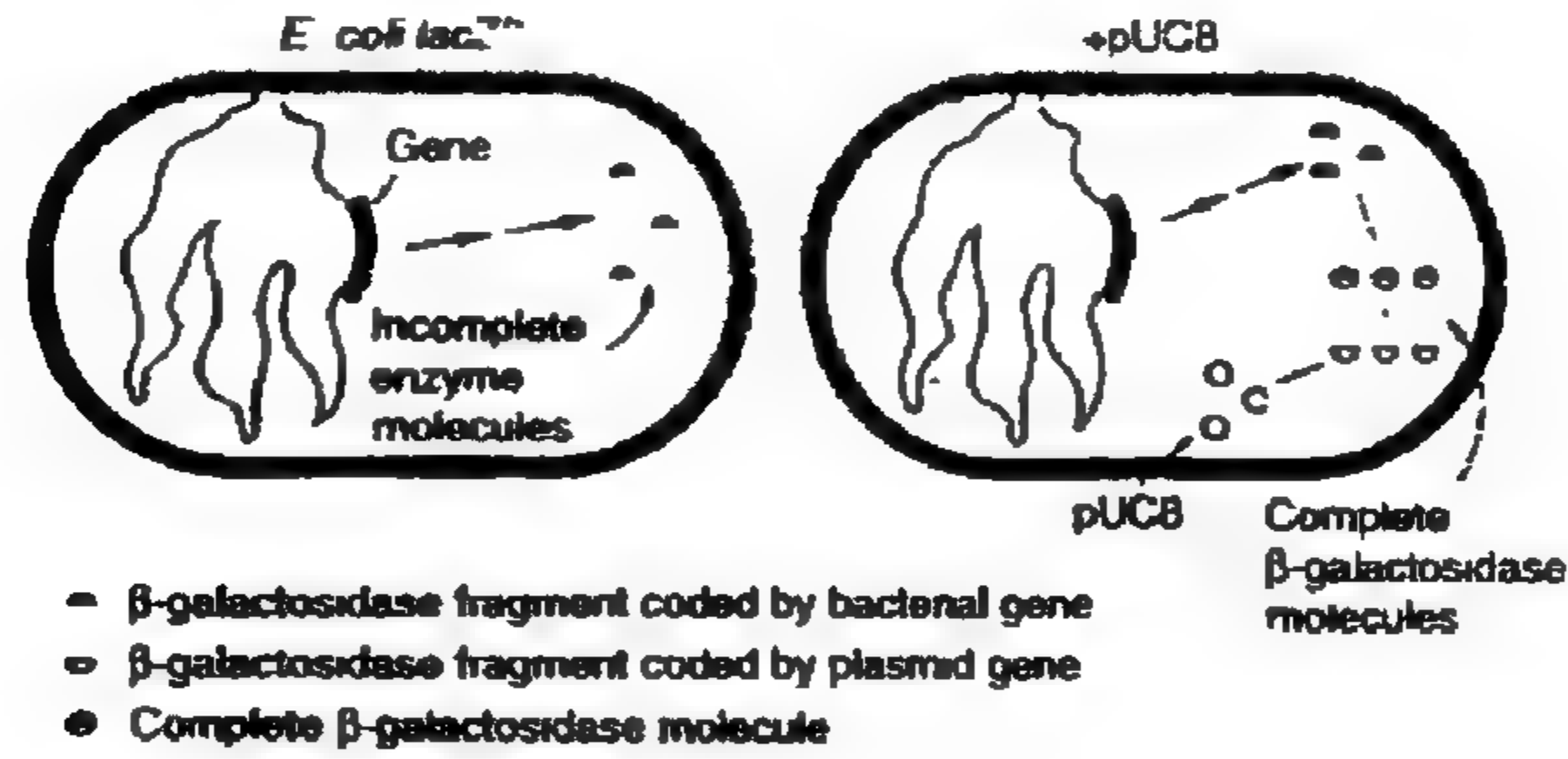
## ١ - التحول الفاجي Transfection :

هي طريقة مماثلة تماماً لحالة التحول البكتيري transformation إلا أنها تستعمل الفاج بدلاً من البلازميد حيث أنه في هذه الحالة يستعمل دنا الفاج النقي (المنقى purified) أو يستخدم جزيء الفاج المعاد صياغته ويتم خلطها بخلايا البكتيريا إ. كولاى التنافسية أى القادرة أى المهيأة competent ويتم تعريض المخلوط لصدمة حرارية heat-shock حيث تساعد هذه المعاملة فى دخول دنا إلى داخل خلية البكتيريا.

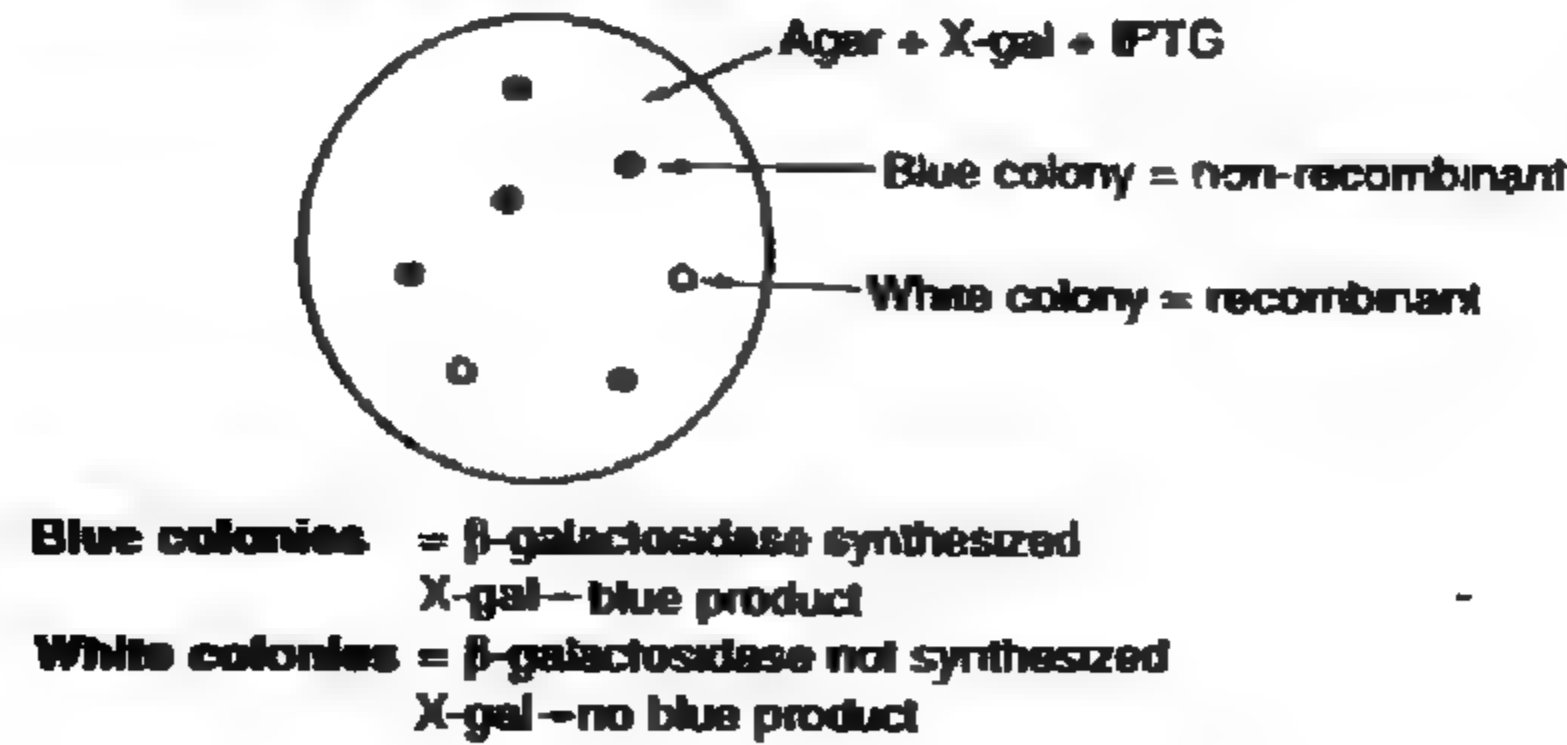
## ٢ - إنتقال الفاج من خلية بكتيريا إلى أخرى Transduction :

وهو عبارة عن إنتقال دنا البكتيريا من خلية بكتيريا إلى خلية أخرى بواسطة الفاج جزيئات الفاج التى تقوم بهذه العملية تسمى الجزيئات الناقلة transducing particles يوجد نوعين من transduction وهما العام والخاص generalized transduction and specialized transduction.

(a) The role of the *lacZ'* gene



(b) Screening for pUC8 recombinants

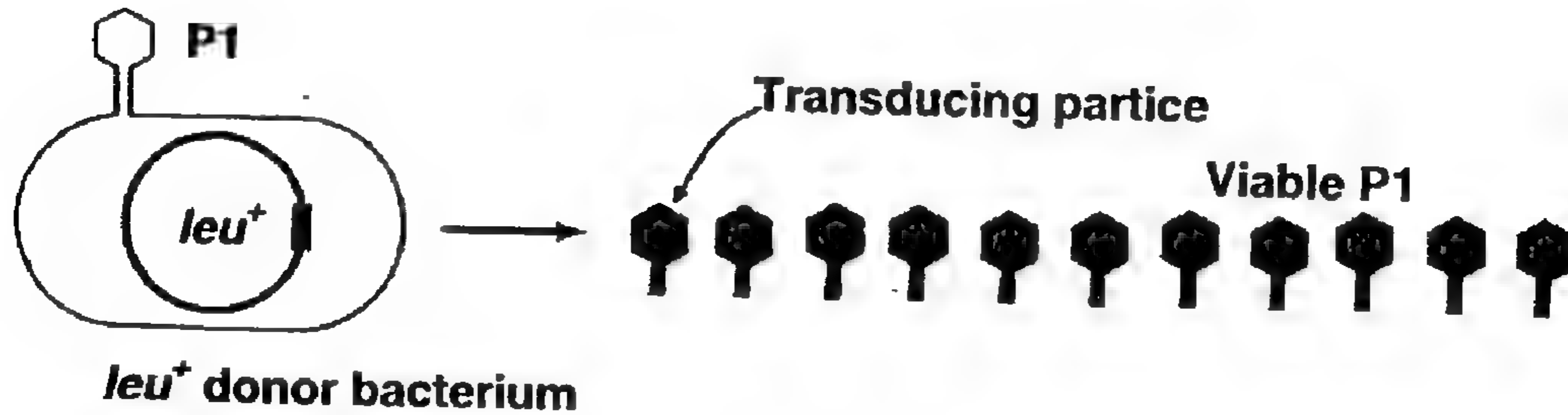


شكل ١٠٢: حالات التثبيط التداخلي للجين *lac Z'* بواسطة البلازميد pUC8، (a) جينات البكتيريا والبلازميد تكمل بعضها لتخليق إنزيم بيتا جالاكتوسيديز، (b) التعرف على الخلايا المعاد صياغتها بواسطة التنمية على آجار محتوى X-gel وأيضا IPTG (إنتخاب Lac selection Lac).



الفاج ذو النقل العام generalized transducing phage يكون بعض جزيئات من الفاج تحتوى على دنا البكتيريا فقط وأن هذا الجزء من دنا يشتق من أى جزء من الكروموسوم البكتيرى وليس من جزء معين (شكل ١٠٣).

الفاج ذو النقل الخاص specialized transducing phage ينتج عنه فاجات يتكون دنا الخاص بها من جزئين جزء من دنا البكتيريا وجزء من دنا الفاج وهكذا فإن جزيء دنا الخاص بالفاج يحتوى على جينات من البكتيريا وجينات من الفيروسات، كما أن جينات البكتيريا تشتق من منطقة خاصة من الكروموسوم البكتيرى. من أمثلة النقل العام البكتيريا *Salmonella typhimurium* والفاج P22 ومن أمثلة النقل الخاص البكتيريا *E. coli* والفاج P1. سيتم شرح transduction بالتفصيل فى كتاب تال.



شكل ١٠٣ : الفاج P1 يصيب بكتيريا تعتبر مانحة لليوسين *leu+* donor وينتج عن ذلك نسل كله فاج P1 نشط حتى وجزء فاج واحد به دنا البكتيريا transducing particale.

## ٢- تعبئة الفاج صناعياً *in vitro* packaging:

نقل دنا الفاج لامدا بواسطة transfection تكون الطريقة غير الفعالة بدرجة كبيرة وذلك فى حالة مقارنتها مع خلايا بكتيريا مصابة بواسطة جزيئات فاج لامدا ناضجة mature. ولذلك فإنه يكون من المفيد تعبئة دنا الفاج لامدا المعاد صياغته فى جزيء فاج لامدا صناعى تم عمله فى أنبوبة الاختبار.



يبدو لأول وهلة أن هذه الطريقة صعبة ولكنها في الحقيقة سهلة ويمكن إنجازها بسهولة. تعبئة دنا يحتاج إلى عدد من البروتينات المختلفة يتم تكوينها وتخليقها تبعاً لشفرات موجودة بالجنيوم أي الطاقم الوراثي وذلك للفاج لامدا، ولكن يمكن إعداد وتحضير هذه البروتينات بتركيزات كبيرة في حالة سلالات من الفاج لامدا ناقصة أو محور فيها جين أو أكثر defective  $\lambda$  phage strains. يمكن عمل ذلك بطريقتين مختلفتين وهما:

#### أ - طريقة السلالة المفردة Single-strain system:

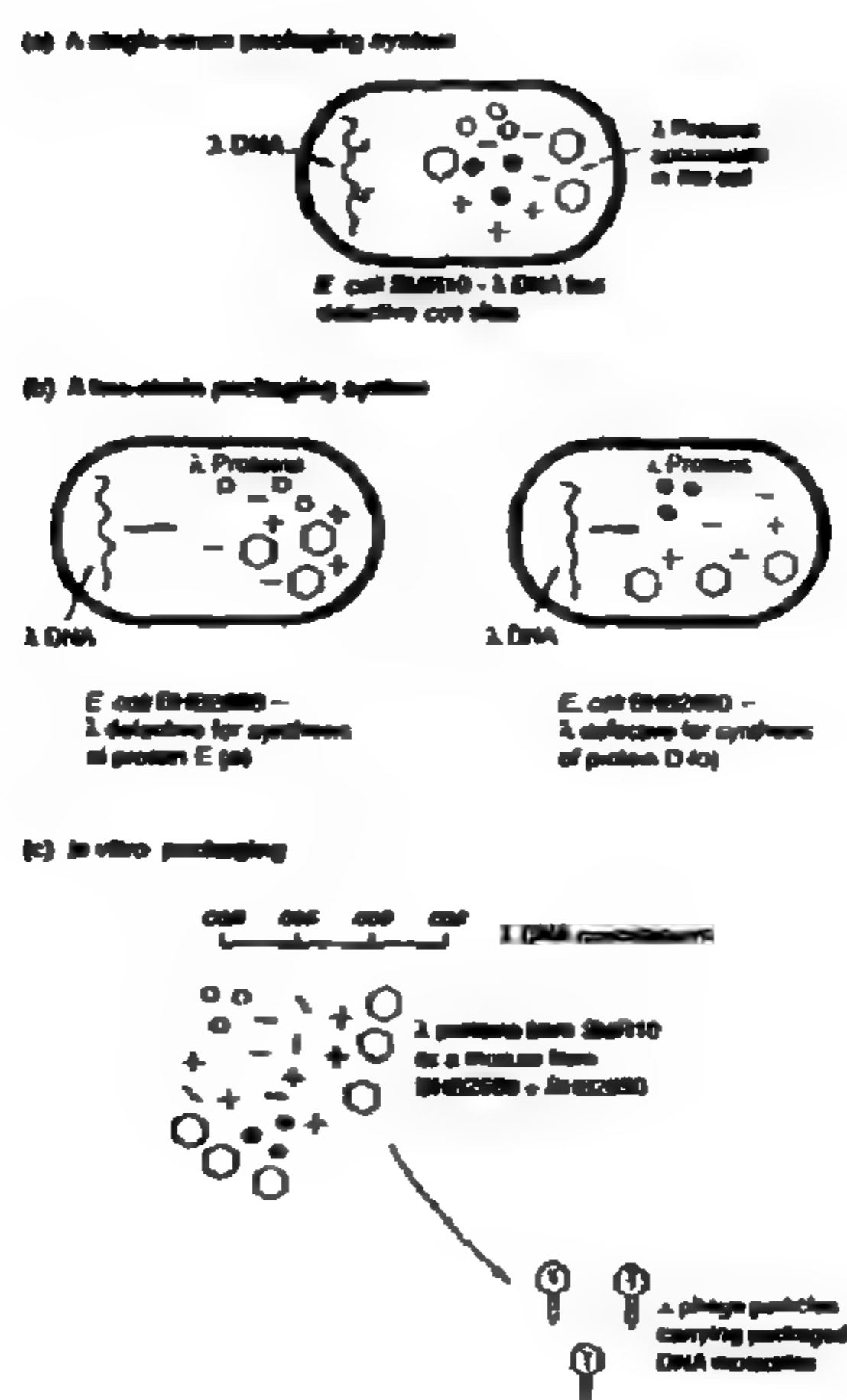
وفيها الفاج لامدا ذو الجين الناقص أو المحور يتميز بحدوث طفرة في المواقع cos ونتيجة لذلك فإن هذه المواقع لا يتم التعرف عليها بواسطة إنزيم endonuclease، وهذه الإنزيم هو المسئول عن فصل الوحدات المتصلة المكونة لدنا concatamers أثناء تكاثر الفاج. وهكذا فإن هذا الفاج الناقص أي المحور أي المتطفر لا يمكنه عمل التكاثر لدنا ولذلك فإن يوجه جميع طاقة التخليق إلى تخليق جميع أنواع البروتين اللازمة لتعبئة دنا. وهكذا فإن البروتين يتجمع بكثرة في خلية البكتيريا ويمكن تنقيته من مزارع البكتيريا إ. كولاى المصابة بحزيمات الفاج لامدا المتطفرة أي المحورة. وهذه البروتينات يمكن أن تستخدم صناعياً في المعمل *in vitro* في تعبئة جزيئات الفاج لامدا المعاد صياغتها (شكل ١٠٤).

#### ب - طريقة السلالتين الناقصتين أي المحورتين Tow defective lambda strains:

في هذه الطريقة نحتاج إلى سلالتين كل منهما يحمل طفرة في جين واحد يكون خاص بتكوين أحد مكونات بروتين غطاء أي غلاف الفاج phage protein coat، حيث أنه في سلالة واحدة تكون الطفرة في الجين D وفي السلالة الثانية تكون الطفرة في الجين E (شكل ١٠٤).

لا يمكن لكلا السلالتين أن تكمل دورة حياتها وتصيب خلايا البكتيريا إ. كولاى حيث أنه في غياب أحد البروتينات نتيجة لطفرة في الجين فإنه لا يمكن تكوين بروتين الغلاف capsid structure.

يلاحظ أن يتم تكوين وتجمع وتركيز للبروتينات الأخرى في خلية البكتيريا عدا البروتينات الناقصة يتم عمل التعبئة الصناعية للفاج وذلك بخلط cell lysates للبكتيريا إ. كولاى لكلا السلالتين خلط جيد. يلاحظ أن أحد السلالتين مصاب بالفاج لامدا متطفر في الجين المخلق للبروتين D ولذلك لا يخلق هذا البروتين وهكذا نتيجة لخلط السلالتين فإن يتم تكوين وتعبئة الفاج في أنبوبة اختبار لأن البروتينات ستكون متكاملة (شكل ١٠٤).



شكل ١٠٤ : التعبئة للفاج صناعياً، (a) تخليق بروتين الغلاف capsid للفاج لامدا بواسطة خلية البكتيريا إ. كولاى SMR10 والتي تحمل الفاج لامدا الذي ينقصه أماكن cos sites نتيجة لحدوث طفرة فيها أى تم تحويلها، (b) تخليق بروتينات غير كاملة (أقل من العدد أى بها نقص) خاص بالغلاف capsid للفاج لامدا بواسطة سلالتين من البكتيريا إ. كولاى BHB2688، BHB2690، (c) خلط cell lysates لسلالتين البكتيريا السابقتين في (b) مع بعضهما يكون نتيجة تكوين وتخليق البروتينات اللازمة للغلاف capsid كاملة تماماً ويتم تعبئة دنا لامدا فيها في أنبوبة اختبار.

فى كلا الحالتين السابقتين فإن جزيئات الفاج المعبأة صناعياً يمكن أن تستخدم فى إصابة خلايا البكتيريا إ. كولاى وذلك بإضافة معلق من جزيئات الفاج المعبأة صناعياً إلى مزارع البكتيريا وهكذا تحدث الإصابة بالفاج لأمدا طبيعياً للخلايا وذلك بحقن دنا فى خلية البكتيريا.

**كيفية التعرف على إصابة خلايا البكتيريا بالفاج بالعين المجردة بواسطة plawues على بيئة الآجار:**

يمكن أن يكون الطور النهائى لدورة الإصابة بالفاج لخلية بكتيريا هو تحلل هذه الخلية البكتيرية cell lysis، لو أن الخلايا البكتيرية المصابة نشرت بالتساوى (وزعت بالتساوى) على بيئة آجار بعد إضافة الفاج أو بعد حدوث transfection بواسطة دنا الفاج فإن الخلية تتحلل ويمكن ملاحظة ذلك بواسطة رؤية plaques على سطح الآجار (plaque منطقة رائقة نسبياً ولا تحتوى على خلايا بكتيريا سليمة وحية) (شكل ١٠٥) كل plaque منطقة رائقة تتكون نتيجة لتحلل خلية البكتيريا بالفاج ثم ينتقل الفاج إلى خلايا أخرى مجاورة ليصيبها وهكذا تتكون منطقة من الخلايا الميتة تكون رائقة تسمى plaque.

من المعروف أن تكوين الفاج داخل الخلية البكتيرية يتكون عاى تلقائياً. وأن الوقت من حقن DNA إلى إنتاج جزيئات فاج جديدة قد يستغرق أقل من عشرون دقيقة. وتصبح الخلية البكتيرية مجرد غلاف يحتوى على مئات من جزيئات الفاج. ثم تنتج جزيئات الفاج إنزيم يسبب تحطيم جدار الخلية البكتيرية لتحرر جزيئات الفاج وتصيب خلايا بكتيرية جديدة.

ينتج جزيء فاج واحد داخل الخلية البكتيرية الواحدة مئات من الفاج. وكل فاج من المائة يصيب خلية بكتيرية ويكون مئات وعند تكرار هذه الحالة أربعة مرات فقط فإن فاج واحد يؤدى إلى موت ما يزيد عن بليون خلية بكتيرية. أما عند إضافة عدد قليل من الفاج إلى مزرعة بكتيرية كثيفة وقبل انفجار أى خلية بكتيرية نتيجة للإصابة



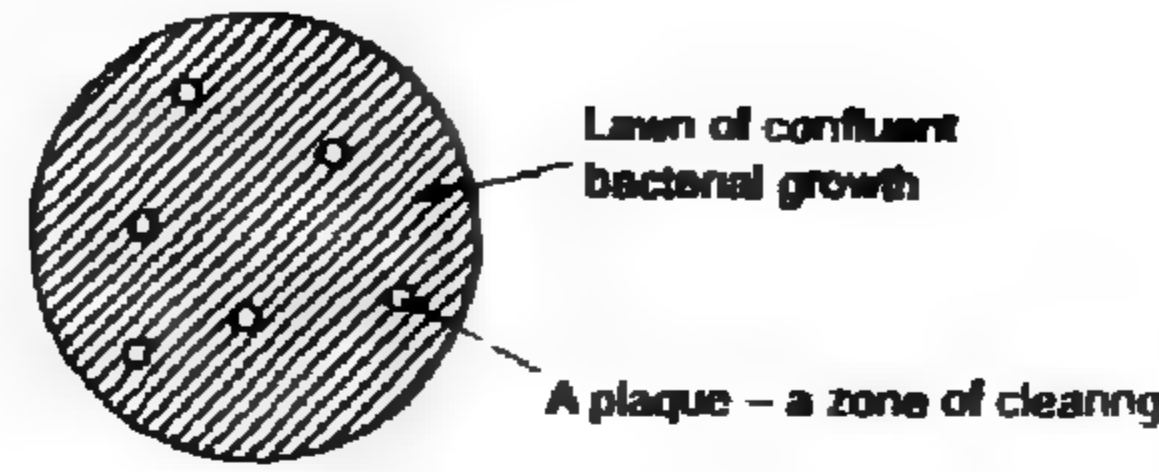
بالفاج فإن يتم توزيع ونشر خلايا هذه المزرعة على سطح بيئة آجار مغذى. وفى خلال عشرون إلى ثلاثون دقيقة فإن الخلية البكتيرية الأولى المصابة تنفجر وتحرر جزيئات. الفاج وهذه تصيب خلايا أخرى وهكذا تكرر العملية ولذلك فإنه تتكون تدريجياً حلقات من الخلايا الميتة حول أول خلية بكتيرية وهكذا تتسع الحلقات وفى هذه الأثناء أيضاً تتكاثر الخلايا البكتيريا غير المصابة وحيث أن عدد هذه الخلايا كبير بالنسبة لعدد الخلايا المصابة فإن الخلايا السليمة تكون طبقة وتغطي سطح الآجار. وبعد أن يغطي سطح البيئة تماماً بالخلايا البكتيرية تتوقف الخلايا عن التكاثر وأيضاً يتوقف الفاج عن التكاثر لأنه معتمد على الخلايا البكتيرية. وفى النهاية توجد بعض الحفر holes المستديرة فى سطح النمو البكتيرى وهذه تحتوى على خلايا ميتة نتيجة لتأثير الفاج وتسمى plaques. يعتبر كل plaque ناتج من فاج واحد عادة. يكون فطر plaque حوالى ٣-٤ مم. يمكن تعريف كلمة plaque أى مكان وجود الفاج وموت الخلايا البكتيرية وتكوين منطقة رائقة نسبياً.

كلا من الفاج لامدا والفاج M13 يمكن أن يكون plaques وفى حالة الفاج لامدا تتكون true plaques تتكون نتيجة لتحلل الخلايا. وفى حالة plaques الفاج M13 فهي تكون مختلفة حيث أن الفاج لا يسبب تحلل خلايا البكتيريا وبدلاً من ذلك فإن الفاج يسبب نقص فى سرعة نمو الخلايا المصابة ويكون ذلك كاف لتكوين منطقة رائقة نسبياً فى المسطح البكتيرى bacterial lawn. بالرغم من أن هذه plaques غير حقيقية إلا أنها تكون مماثلة للـ plaques العادية (شكل ١٠٥).

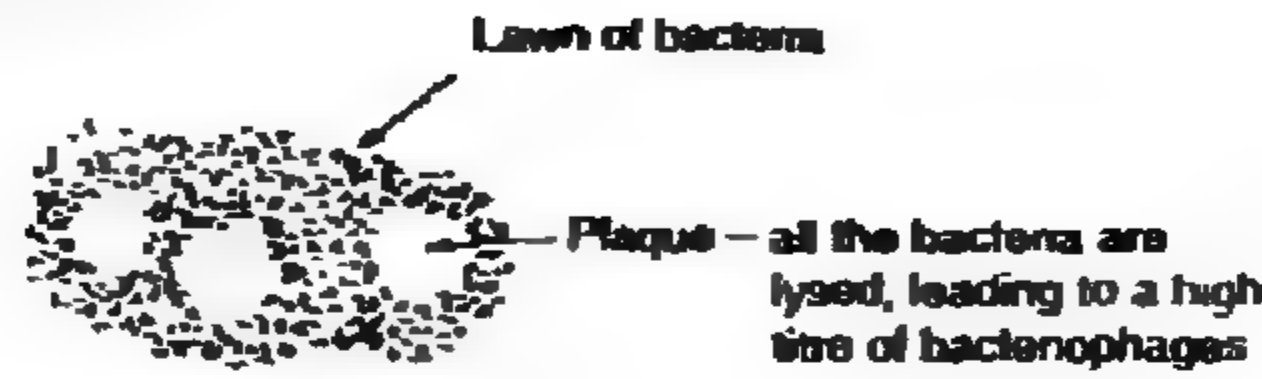
النتيجة النهائية لتجربة توطين جين بواسطة الفاج لامدا أو الفاج M13 هو تكون plaques على سطح طبق الآجار. كل plaque واحد إشتق من خلية بكتيرية واحدة سواء transfected أو infected وهكذا فإنها تحتوى على أعداد كبيرة من الفاجات متماثلة فى تركيبها الوراثى تماماً identical phage particles. هذه plaques تحتوى على جزيئات فاج self ligated أو تحتوى على جزيئات فاج معاد صياغتها.



(a) Plaques on a lawn of bacteria



(b) Lytic plaques



(c) M13 plaques



شكل ١٠٥ : plaques الفاجات، (a) ظهور plaques على مسطحات البكتيريا lawn of bacteria، (b) plaques نتجت بواسطة فاج يحلل خلية البكتيريا مثل الفاج لامدا. plaque على خلايا متحللة ميتة وجزيئات فاج لامدا، (c) plaques نتجت بواسطة الفاج M13 نتيجة لبطء في سرعة نمو الخلايا. ويتكون plaque من خلايا بكتيريا بطيئة النمو وجزيئات فاج M13.

## كيفية التعرف على الفاجات المعاد صياغتها

### Identification of Recombinant Phages

توجد طرق عديدة يمكن بها التعرف وتمييز plaques المعاد صياغتها وفيما يلي أهم الطرق (شكل ١٠٦):

#### ١ - تأثير مثبط تداخل للجين *lac Z'* المحمول بالفاج الناقل الوسيط

**Insertional inactivation of a *lac Z'* gene carried by the phage vector:**

جميع أنواع الناقل الوسيط M13 وأيضاً بعض أنواع الناقل الوسيط لامدا تحمل نسخة من الجين *lac Z'*. إدخال دنا جديد في هذا الجين يثبط تخليق الإنزيم بيتا

جالاكتوسيديز وتاماً كما في حالة البلازميد الناقل الوسيط pUC8. يمكن تمييز دنا المعاد صياغته وذلك بزراعة البكتيريا على بيئة x-gal agar و plaques المحتوية على الفاجات العادية تكون زرقاء بينما المحتوية على الفاجات المعاد صياغتها تكون رائقة.

## ٢- تأثير مثبت تداخلي للجين *cI* المحمول بالفاج لامدا

### Insertional inactivation of the $\lambda$ *cI* gene:

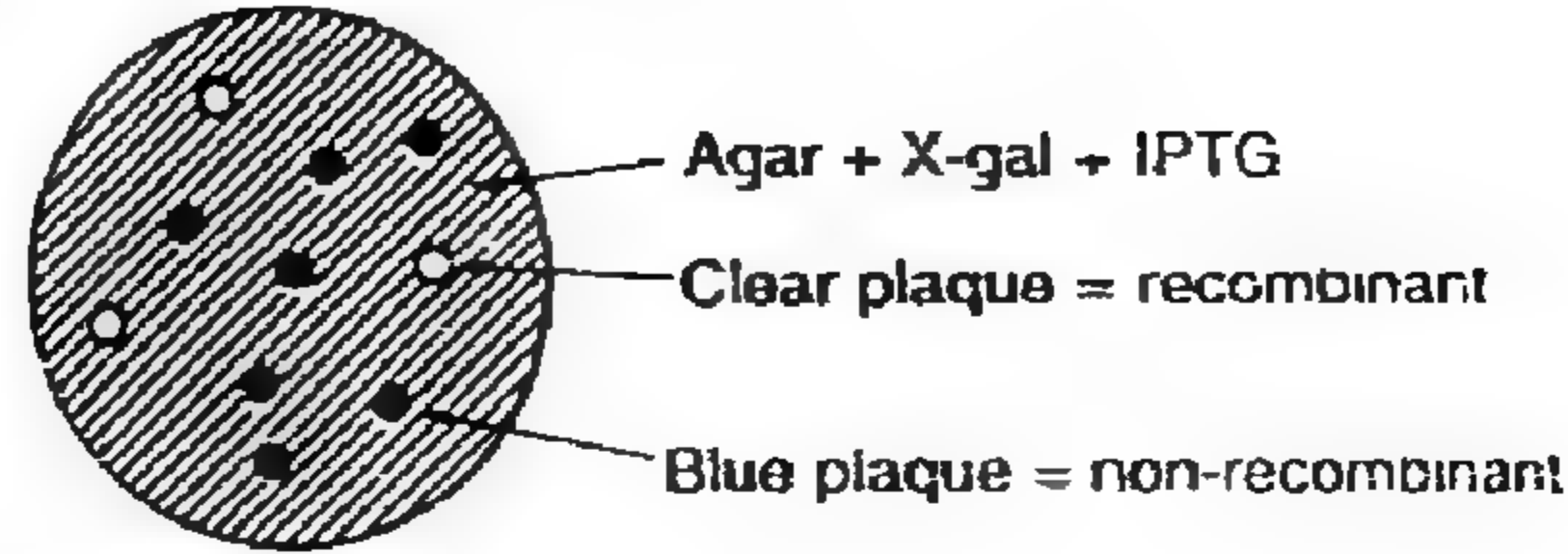
عديد من أنواع الناقل الوسيط لامدا لها مكان قطع محدد restriction site مميز في الجين *cI* gene (الموقع على الخريطة ٣٨). إدخال دنا جديد في هذا الجين يحدث له تثبيط ويسبب تغيير في الشكل الظاهري للبليك plaque. البليكات plaques العادية تكون عكرة turbid بينما المحتوية على فاجات معاد صياغتها نتيجة للخلل في تركيب الجين *cI* تكون رائقة clear. يمكن تمييز الفرق بين المستعمرتين بسهولة بالعين المجردة الخبيرة.

## ٣- الإنتخابات باستخدام الشكل الظاهري *Spi*:

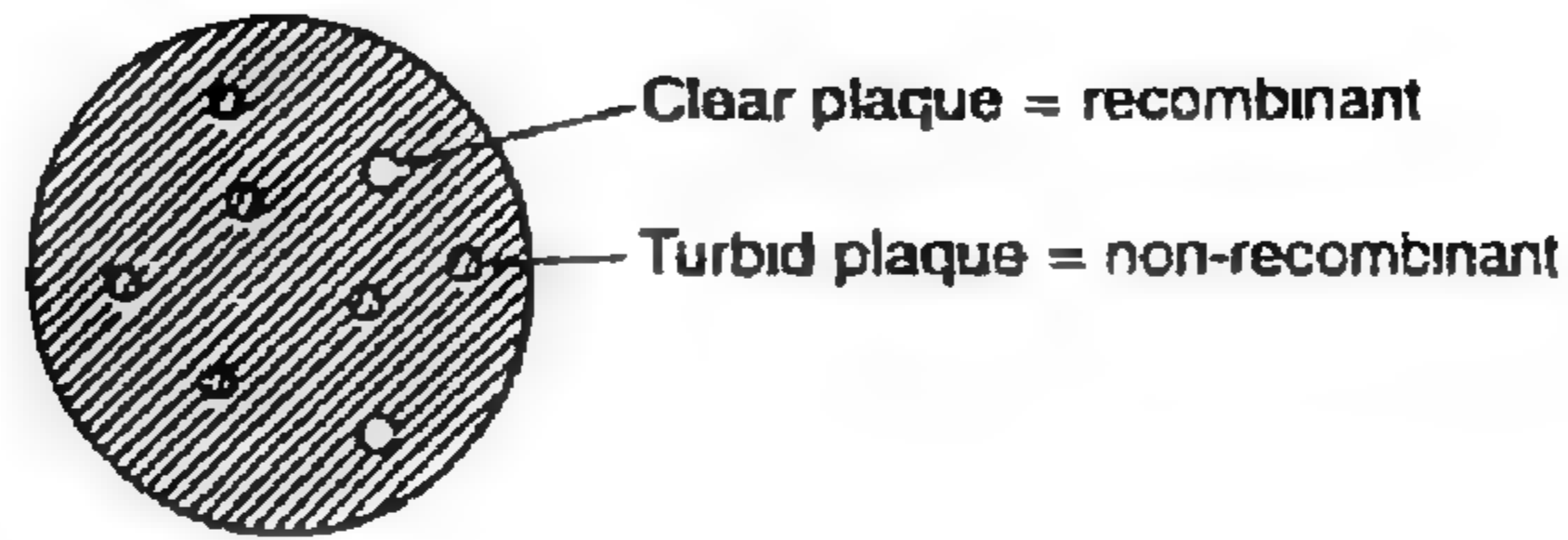
### Selection using the *Spi* phenotype:

الفاج لامدا لا يمكنه إصابة البكتيريا إ. كولاى بسهولة وذلك فى حالة إحتواء خلاياها على جزء من المادة الوراثية لفاج مقارب له related يسمى P2. وفى هذه الحالة تعتبر لامدا عبارة عن  $Spi^+$  أى تسمى  $Spi^+$  (أى تكون حساسة للتثبيط بالبروفاج P2). أمكن تصميم وعمل بعض حالات من الفاج لامدا المستخدم كناقل وسيط متحرك ليصبح  $Spi^-$  وذلك بإدخال شظية من دنا أى أنه تم تحويل الفاج من  $Spi^+$  إلى  $Spi^-$  وتبعاً لذلك فإن دنا المعاد صياغته أى  $Spi^-$  يمكن أن يصيب خلايا تحمل البروفاجات P2 prophages. تستخدم هذه الخلايا كعائل لتجارب التوطن بواسطة هذه الناقلات الوسيطة المتحركة وهكذا يكون  $Spi^-$  هو الوحيد المعاد صياغته وهكذا فإن البليكات plaques تتكون فقط فى حالة هذه الناقلات الوسيطة المعاد صياغتها  $Spi^-$ .

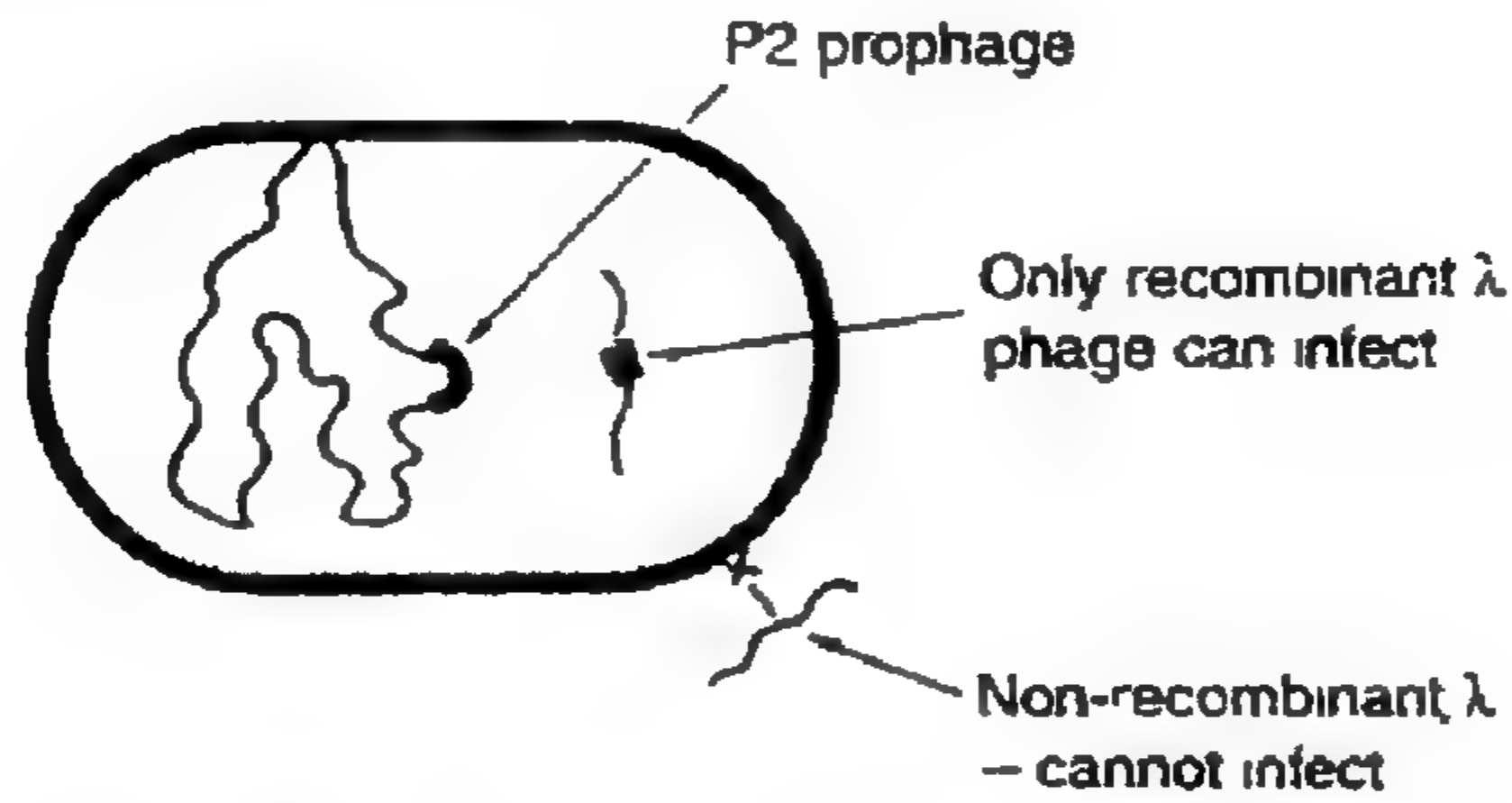
(a) Insertional inactivation of the *lacZ'* gene



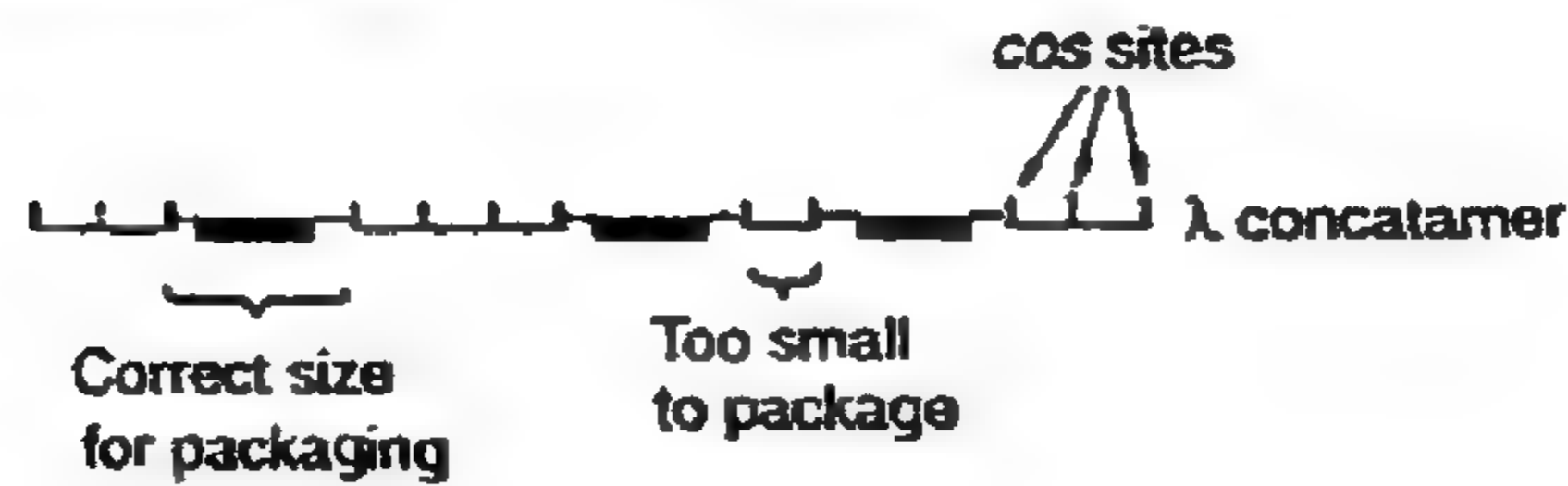
(b) Insertional inactivation of the  $\lambda$  *cl* gene



(c) Selection using the Spi phenotype



(d) Selection on the basis of  $\lambda$  genome size



شكل ١٠٦: الطرق المختلفة للتعرف على الفاجات المعاد صياغتها.

٤- الانتخاب على أساس حجم الطاقم الوراثي للامدا:

**Selection on the basis of  $\lambda$  genome size:**

النظام الخاص بتعبئة الفاج لامدا في أنبوبة الاختبار أى النظام الناتج عن التركيب الوراثي يعمل على تجميع جزيئات لامدا لتكوين الفاج الناضج لا يمكنه تعبئة جزيئات

دنا فى رأس الفاج إلا عندما يكون حجمه بين ٣٧ إلى ٥٢ كيلو قاعدة kb. أى أن جزء من دنا أقل من ٣٧ كيلو لا يمكن تعبئته. كثير من الناقلات الوسيطة المتحركة vectors من النوع لامدا تم بناؤها بإزالة قطع كبيرة من جزيئات دنا للفاج لامدا ولكنها أقل من ٣٧ كيلو قاعدة فى الطول (إزالة قطع من جزيء دنا تكون عادة من المنطقة الوسطية لدنا الفاج والتي تتركز فيها الجينات الخاصة بإتصال وإفصال دنا الفاج بالكروموسوم البكتيرى ولذلك فإن الفاج الناتج الناقص هذه المنطقة لا يمكنه عمل lysogeny ولكن يقوم بدوره lysis عادى، أى ينقصه القدرة على عمل lysogeny). هذه الدنا الناقصة لا يتم تعبئتها فى الفاج وتكوين جزيء فاج ناضج إلا بعد إضافة جزء إضافى من دنا وهكذا يصبح الحجم النهائى للطاقم الوراثى أى الجينوم هو ٣٧ كيلو قاعدة أو أكثر. وهكذا يكون هذا الفاج الأخير المعاد صياغته هو القادر على التكاثر وإتمام دورة الحياة وبالتالي تمييزه عن الفاجات الأخرى.

### التحول للخلايا الغير بكتيرية

#### Transformation of Non-Bacterial Cells

نحتاج إلى طرق مختلفة فى حالة إدخال دنا إلى خلايا الخميرة والفطريات والحيوان والنبات والإنسان عند إستخدام هذه الكائنات كعائل لتوطين الجين. عامة نقع الخلايا فى محلول ملح معين يفيد فقط فى قليل من أنواع البكتيريا بالرغم من أن المعاملة بواسطة كلوريد الليثيوم أو خلاات الليثيوم تزيد من سرعة أخذ ودخول وإختراق دنا فى خلايا الخميرة ولذلك تستخدم بكثرة فى حالة خميرة الخباز أى خميرة البيرة ولكن فى الكائنات الحية الأخرى تستخدم طرق أكثر تقدماً.

#### التحول فى الخلايا المفردة Transformation of individual cells:

فى كثير من الكائنات الحية يكون جدار الخلية هى الحاجز الرئيسى فى إعاقه دخول دنا. ولذلك فى حالة زراعة خلايا الحيوان والتي بالطبع ينقصها جدار خلوى



يمكن تحويلها بسهولة *easily transformed* وخاصة عند ترسيب دنا على سطح الخلية بواسطة محلول فوسفات الكالسيوم (شكل ١١٢).

وفي حالة الخلايا التي لها جدر مثل النبات والفطريات ومنها الخميرة لا بد من إزالة الجدار وذلك بإنزيمات تحلل هذه الجدران وهو متوفر بكثرة وبذلك يمكن الحصول على البروتوبلاست. يمكن في بعض خلايا النبات والتي تكون كبيرة الحجم التخلص من الجدار بعمل بلزمة مبتدئة ثم قطع الجدر بآلة قطع دقيقة وبعد ذلك يتم تحرير البروتوبلاست العارى أى الخالى من الجدار (شكل ٧٣).

#### عزل البروتوبلاست المفرد من الخلية Protoplast isolation:

الخلية النباتية لها جدار خلوى صلب نسبياً يحيط بالبروتوبلاست. غشاء البلازما *plasmalemma* فى الخلية النباتية بالرغم أن له دور رئيسى فى تخليق الجدار الخلوى إلا أنه غير ملتصق بشدة بالجدار الخلوى. وهو مجاور للجدار الخلوى ويبطنه ولكنه غير ملتصق بشدة معه. الإتصال الفيزيائى بين البلازما والجدار الخلوى يتحكم فيه ضغط الإنتفاخ فى خلية النبات وعادة يوجد إتصال لأن الخلايا النباتية العادية توجد فى صورة غير مبلزمة ويكون لها ضغط أسموزى عالى نسبياً يجعل البروتوبلاست بما فيه البلازما يضغطان على الجدار الخلوى لتصبح الخلية نضرة. وفى حالة نقص الماء وذبول النبات يحدث للخلايا عكس ما سبق تماماً حيث ينكمش البروتوبلاست نسبياً ويتباعد البلازما نسبياً عن جدار الخلية ثم ينعكس الحال فى حالة توفر الماء. وفى حالة البلزمة يمكن أن تؤثر على البلازموديزماتما التى تصل الخلايا ببعضها وتسبب أضرار لها وفى حالة البلزمة الشديدة تفسد خيوط البلازموديزماتما. ولذلك فى حالة إزالة الجدار من الخلايا المبلزمة بلزمة إبتدائية فإنه يمكن إزالة جدار الخلية بسهولة جداً ويتحرر البروتوبلاست فى محلول البيئة المسببة للبلزمة (البيئة المسببة للبلزمة فى هذه الحالة تسمى *plasmolyticum* أو *osmoticum*).

أمكن بهذه الطريقة عزل البروتوبلاست من الجذور والأوراق والسيقان والأوراق والبتلات والثمار وغمد الريشة والأعضاء المخزنة وحبوب اللقاح والعقد الجنرية فى النباتات البقولية وأيضاً من نسيج الكالس ومن معلق خلايا النبات cell suspension. ونفس الفكرة تنطبق على الفطريات والطحالب لعزل برتوبلاست.

\* أما عن طريقة تحرير البروتوبلاست من جدار الخلية فيتبع ما يأتى

**Methods of protoplast release:**

- جميع أنواع البروتوبلاست المحررة من أى نوع من الخلايا تشترك فى صفة واحدة هامة أنها هشة الأسموزية أى حساسة للأسموزية بدرجة شديدة osmotically fragile ولذلك قبل فصل الجدار لابد من تنظيم وتثبيت حالة الخلية بالنسبة لذلك stabilized with a solution ومعاملتها معاملة خاصة ويكون ذلك بواسطة غمرها فى محلول فوقى التركيز (زائد التركيز) hypertonic بدرجة مناسبة ولا يكون فوقى التركيز بشدة too hypertonic، لأنه إذا لم يتبع ذلك فإنه بعد إزالة الجدار سينفجر البروتوبلاست تبعاً لإزالة الضغط الجدارى.

- وبعد ذلك ولأنها بروتوبلاست محررة عارية (عديمة الجدار) فإن يجب معاملتها برفق وحرص شديد باستمرار لأنها تكون غير قادرة على تحمل الصدمات الفيزيائية ومنها مثلاً الرج الشديد وغيرها حيث أن الجدار يقى البروتوبلاست من ذلك.

- يتم إزالة الجدار إما ميكائيكياً أو إنزيمياً وفى كلا الحالتين لابد أولاً من عمل بلزمة مبتدئة للخلايا بواسطة محلول من المانيتول mannitol أو السريبيتول sorbitol. تفضل هذه المحاليل لأنها خاملة التحول الغذائى نسبياً metabolically relatively inert محاليل السكريات الأخرى مثل الجلوكوز والسكرور يتم إمتصاصها بالخلية وتحولها غذائياً بكفاءة عالية وخاصة أثناء الفترات الطويلة نسبياً اللازمة للمعاملة بالإنزيمات. وفى حالة السكريات

الأخيرة يكون البروتوبلاست المعزول غير ثابت عند زراعته بعد ذلك *instability during subsequent culture*. أما عن الضغط الأسموزي المناسب فإنه لابد من عمل تجارب لضبط التركيز لأنه يختلف باختلاف الأنسجة ومثال ذلك أن بروتوبلاست خلايا أوراق التبغ واللوبيا يتم معاملتها بمحلول ١٣% (٠,٧ جزيء) من المانيتول بينما بروتوبلاست خلايا كالس التدرن التاجي لنبات فيرجينيا الزاحف - Virginia cr- (*Parthenocissus tricuspidata*) *eeper* يستعمل محلول ١١% من المانيتول. البروتوبلاست المعزول الحر الطازج يجب أن يكون كروي عدا بروتوبلاست العقد الجذرية. محلول تحت التركيز *under plasmolysis* يسبب انفجار البروتوبلاست ومحلول فوقى التركيز بشدة *over plasmolysis* يسبب مظهر متعرج ملتو *crenate appearance*.

\* تحرير البروتوبلاست ميكانيكياً *Mechanical isolation* يمكن عمله كما يأتى:

- يتم قطع الخلية المبلزمة بموس حاد ويتم تحرير البروتوبلاست من الجدار المقطوع وذلك بطرق عديدة ومنها الضغط برفق على النسيج *gently squeezing* أو خفض تركيز المحلول الفوقى التركيز تدريجياً والذي يحيط بالبروتوبلاست بدرجة معتدلة ويتحرر من الجدار المقطوع. وفي الحقيقة أن هذه الطريقة معروفة منذ زمن طويل حيث يعتبر J. Klerker عام ١٨٩٢ أول من ذكر تحرير البروتوبلاست من الخلية من نبات يسمى بالترجمة الحرفية العسكى المائى *(Stratiotes aloides) water soldier* بالطرق الميكانيكية.

استخدمت هذه الطريقة بعد ذلك فى عزل البروتوبلاست من خلايا حراشيف بصلة البصل ومن الجدار الثمرى الأوسط *mesocarp* للخيار ومن أنسجة مخزنة. عامة من عيوب هذه الطريقة أن المحصول من البروتوبلاست قليل، وأنها تلتهم الخلايا الكبيرة

فقط.



\* تحرير البروتوبلاست إنزيمياً Enzymatic isolation :

وهو عبارة عن إزالة جدار الخلايا بواسطة إنزيمات التحليل المائي hydrolytic enzymes. الجدار الابتدائي في النباتات الراقية يتكون من هيكل من السيليلوز. في حالة الخلايا الصغيرة والتي لم تتشكل بعد والتي توجد مثلاً في منطقة الإستطالة وسنأخذ مثلاً لها جذور نبات ذرة صغير فإن كمية السيليلوز في الجدار الخلوي تكون ٢٥ إلى ٤٠% من الوزن الجاف. السكريات الأحادية الأخرى خلاف الجلوكوز الذي يدخل في تركيب السيليلوز هي مانوز وجالاكتوز وزيلوز يحدث لها بلمرة لتعطى ماثان وجالاكتان وزيلان وهي سلاسل قصيرة يتكون منها الهيميسيليلوز والذي يكون ٥٠% من الوزن الجاف للجدار الخلوي، يوجد في الجدار أيضاً دهون ٥-١٠% من الوزن الجاف وبروتين حوالى ٥% من الوزن الجاف. هذه النسب بين المكونات المختلفة تختلف بتشكل الخلايا وعادة تزداد كمية السيليلوز وأيضاً بكبر السن. والسيليلوز يكون ٩٤% من الوزن الجاف لجدار شعرة القطن الناضجة. في بعض أنواع الخلايا يقل تركيز الهيميسيليلوز والبروتين والدهون أو قد يختفى ولكن يزيد تركيز كل من اللجنين والبلمرات العطرية مثل phenylpropane with p-coumarylic and sinapylic acid أثناء تشكلها. بين الخلايا توجد الصفيحة الوسطى والتي تتكون أساساً من حامض البكتيك والذي يوجد في صورة أملاح الكالسيوم والمغنيسيوم وهو المسئول عن ربط ولحم الخلايا ببعضها.

التركيب الكيماوى للجدار الابتدائي والصفيحة الوسطى يجعلها قابين للتحلل بالإنزيمات مثل السيلوليز والهيميسيليز والبكتينيز. وهذا الاختلاف في تركيب جدر الخلايا يحتاج خليط من إنزيمات مختلفة ذات تركيزات مختلفة وذات فترة حضارة مختلفة وذلك يختلف لكل نسيج. أنسجة الورقة تحتاج المعاملة بمخلوط من إنزيمات السيلوليز والبكتينيز وذلك ليحرر البروتوبلاست. في بعض الثمار يحدث تحلل طبيعي للصفيحة الوسطى أثناء النضج ويسبب تحرر وإفصال الخلايا ومن هذه الخلايا يمكن تحرير البروتوبلاست بواسطة إنزيم السيلوليز. وفي حالة الثمار ذات



المحتوى البكتيني المرتفع يحدث تحرر للبروتوبلاست بواسطة البكتينيز. بعض جدر الخلايا يمكن إزالتها بالإنزيمات ذات التحليل المائي والبعض الآخر يكون مقاوم تماماً للتحلل بالإنزيمات. أغلب الإنزيمات المحللة لجدران الخلايا والتي تستخدم لهذا الغرض تستخلص من الفطريات. تحرير البروتوبلاست من خلايا قمة الجذر للطمطم بواسطة Cocking عام ١٩٦٠ باستخدام السيلوليز، وهذا الإنزيم تم إنتاجه بواسطة ترسيب البروتين من راشح مزارع الفطر *Myrothecium verrucaria*، وكان هذا أول إنجاز في هذا الصدد وهو استخدام الإنزيمات في تحرير بروتوبلاست الخلايا. إنزيمات السيليليز المستخرجة من الفطريات موجودة تحت أسماء كثيرة تجارية مثل Cellulase Onozuka، Meicelase P، Driselase G، Rhozyme وهي بالإضافة لها نشاط إنزيم الهيميسيليليز أيضاً.

وعامة تحضير إنزيم السيليليز صناعياً سهل نسبياً. يتم تنمية الفطر *Trichoderma viride* على بيئة نخالة حبوب القمح wheat bran مع وجود تهوية جيدة وذلك في حضان على درجة حرارة ٢٥ درجة مئوية لمدة ثلاثة أيام. يتم أخذ المزارع ويتم عصرها وغسلها ثم ترشح ويوجد إنزيم السيليليز في الراشح ويتم ترسيبه بواسطة كيريتات الأمونيوم. يتم عمل إزالة للملوحة de-salted للإنزيم ثم التركيز ثم الرش - التجفيف spray-dried ليتكون مسحوق لونه بني فاتح. ومن هذه الطريقة المبسطة فإنه يمكن الحصول على تحضيرات تجارية من الإنزيم ولكن تكون بعض التحضيرات غير نقية تماماً بل ملوثة بشوائب عبارة عن إنزيمات أخرى مثل سيلولوبيز وجلوكانيز وزيلينيز وليبيز وفوسفوليبيز ونيوكليز وشيتينيز، B1-3gluconase (الإنزيمين الأخيرين يستخدمان في إزالة جدر خلايا الفطر) والبكتينيز. يمكن الحصول على بروتوبلاست لكثير من الفطريات الآن.

أما عن إنزيمات pectinases فإنها تنتج بواسطة أنواع الفطر *Rhizopus* وتباع تحت أسماء تجارية منها Macerozyme، Pectinol R10. بالرغم من أن أغلب الإنزيمات المحللة لجدار الخلية تستخلص من الفطريات فإن العصارة المعوية للقواقع

الرومانية (*Helix pomatia*) Roman snails تستخدم في ذلك أيضاً. ويتم عمل ذلك بسحق غدة معينة وهي mid-intestinal gland ويتم الحصول على إفرازها من أمعاء قواقع صائمة (غير مغذاة) جائعة ومقتولة حديثاً. بعض المعامل الخاصة بعزل البروتوبلاست تربي القواقع اللازمة لها. إنزيم القواقع يباع تحت أسماء تجارية في صورة سائلة بإسم Glusulase وفي صورة مسحوق بإسم Helicase.

زيادة نقاوة الإنزيمات التجارية المتخصصة تكون هامة في زيادة كفاءة الفصل للبروتوبلاست. يتم عمل ذلك بإزالة الشوائب ذات الوزن الجزيئي المنخفض أى التنقية بواسطة طريقة تبادل الأيونات باستخدام الراتنجات ion-exchange resins. ثم يتم عمل تجفيف تجميد freeze dried للإنزيم. ولكن في بعض الحالات زيادة نقاوة الإنزيم تسبب نتيجة عكسية حيث تقلل من كفاءة فصل البروتوبلاست، ويبدو في هذه الحالة أن مخلوط الإنزيمات السابقة يكون مطلوب لتقصير مدة الفصل وكفاءتها.

فصل البروتوبلاست بالإنزيمات يمكن عمله بطريقتين وهما sequential method و mixed-enzyme treatment. وسنشرح هاتين الطريقتين في حالة عزل البروتوبلاست من الأوراق أو الخلايا المزروعة cultured cells، ولأن هاتين الحالتين هما الأكثر استعمالاً في حالة عزل البروتوبلاست. قبل معالجة الأوراق بالإنزيمات يجب تقيمها سطحياً بمحلول مناسب مثل كلوريد الزنبيك (المسليماتى) أو هيبوكلوريت الصوديوم أو فوق أكسيد الإيدروجين أو كلوروكس أو المحاليل المشابهة للكلوروكس وفي جميع الحالات تغسل بعد ذلك بالماء المعقم. وعند استخدام الإنزيمات يجب أن تكون معقمة أيضاً ولأنها حساسة جداً لدرجة الحرارة المرتفعة فإنها تعقم بالترشيح.

في حالة sequential method توجد خطوتين:

- يتم نزع بشرة الورثة ثم توضع الأوراث المنزوعة البشرة على هزاز shaker مثل ورق التبغ في محلول إنزيم pectinase.

- أو تعامل الأوراق بطريقة أخرى وهى أن تسحق فى هون فى محلول منظم مناسب مثل أوراق الفول السودانى أو السيقان المتورقة فى نبات الأسبرجس.

وفى كلا الحالتين يتم الحصول على خلايا مفردة. بعد ذلك هذه الخلايا المفردة تحضن فى إنزيم السليليز لإزالة الجدار الخلوى.

البروتوبلاست التى تتحرر من الخلية تطفو على السطح وتجمع وتغسل جيداً لإزالة الإنزيم وبقايا الجدران. هذا البروتوبلاست يرسب فى القاع فى حالة استخدام السربتول أو المانيتول كبيئة plasmolytica، وبعد ذلك فإنه يمكن فصل البروتوبلاست على هيئة راسب pellet عن الأجزاء الأخرى بواسطة طرد مركزى معتدل gentle وأن supernatant يحتوى على الإنزيم وبعض البقايا الدقيقة، يتم إستبعاد هذا الـ supernatant والبروتوبلاست الراسب فى القاع pelleted يتم عمل معلق له مرة أخرى resuspended فى محلول غسيل يحتوى سكروز ليكون بيئة plasmolyticum. ثم يتم عمل طرد مركزى معتدل مناسب فإن البروتوبلاست يطفو أعلى بينما بقايا الخلايا والأجزاء الغير مهضومة ترسب فى القاع. يتم إزالة البروتوبلاست بواسطة ماصة مناسبة Pasteur pipette ثم تغسل وذلك بإعادة عمل معلق منها resuspension ومع طرد مركزى معتدل مناسب فى محلول مانيتول أو محلول سكروز. وهكذا يكون البروتوبلاست معد للتجارب.

هذه الطريقة السابقة تكون مناسبة لبعض خلايا الميزوفيل لبعض الأوراق مثل التبغ ولكن فى حالات أخرى هز أجزاء الأوراق أثناء المعاملة بالبكتينيز يسبب انفجار البروتوبلاست داخل الجدار الخلوى. ولذلك تم عمل تحويل لهذه الطريقة لتفادى هذه المشكلة. فإن الأوراق المنزوعة البشرة يتم تحضيرها فى إنزيم البكتينيز دون هز incubated statically ثم بعد ذلك تحضن فى السليليز دون هز أيضاً. ثم يتم تحرير البروتوبلاست بواسطة هز رقيق gentle agitation. يمكن فى هذه الحالة زيادة كفاءة إختراق الإنزيم للخلايا باستخدام التفريغ vacuum infiltration. ولكن فى هذه الحالة الأخيرة بدون هز يكون عدد البروتوبلاست الناتج قليل.



أما الطريقة الثانية mixed-enzyme treatment فإنها طريقة من خطوة واحدة singlestep حيث يستخدم مخلوط من إنزيمات السيليوليز والبكتينيز وحيث يحدث فصل الخلايا وتحلل الجدار الخلوى فى آن واحد. فإن الأوراق المنزوعة البشرة تحضن بدون هز مع تعريض الميزوفيل لملامسة سطح محلول الإنزيم. البروتوبلاست المتحرر يغسل بواسطة طرق الغسيل السابق نكرها فى الطريقة السابقة.

جميع الحالات السابقة كانت عن كيفية عزل البروتوبلاست من ميزوفيل الأوراق. ولكن بعض الأوراق كما فى التبغ يمكن فصل خلايا البشرة للسطح العلوى والسطح السفلى ويمكن تحرير البروتوبلاست منها باستخدام مخلوط من السيليوليز والبكتينيز. يمكن أن نحصل بهذه الطريقة على بروتوبلاست الميزوفيل وبروتوبلاست خلايا البشرة العليا مثلاً فى حالة إزالة سلخ البشرة السفلى. يمكن فصل بروتوبلاست الميزوفيل عن بروتوبلاست البشرة بواسطة إختلاف طفوهم وذلك بعد عمل الطرد المركزى لهم فى المانيتول أو السربتول فإن بروتوبلاست البشرة يكون لونه أخضر مصفر باهت ويكون طبقة فى الراشح بينما بروتوبلاست الميزوفيل لونه أخضر براق يرسب فى القاع. يلاحظ أن فى هذه الحالة إزالة سلخ البشرة السفلى أولاً. ولذلك بعد إتمام الطريقة السابقة فإن البقايا بعد الهضم التى تبقى على سطح الإنزيم تكون طبقة الكيوتيكل والخلايا الحارسة. حيث أن جدر الخلايا الحارسة تكون مقاومة للتحلل بالإنزيم.

أما بالنسبة لحالات عزل البروتوبلاست من الخلايا المنزرعة cultured cells تستخدم الطريقة الثانية أى مخلوط الإنزيمين. عامة الأنسجة الهشة من الخلايا المنزرعة تكون مفضلة لأنها تسهل إختراق الإنزيم. فى هذه الحالة للخلايا المنزرعة من الجزر وفول الصويا وبعض حالات من التدرن التاجى وأيضاً من نبات فيرجينيا الزاحف virginia creeper ينتج عنها كميات كبيرة من البروتوبلاست.

عامة فى جميع الحالات السابقة تقابل صعوبات ومشاكل أثناء العمل خاصة بكل حالة ويجب حلها وفيما يلى أمثلة لبعض منها وكيفية حلها.



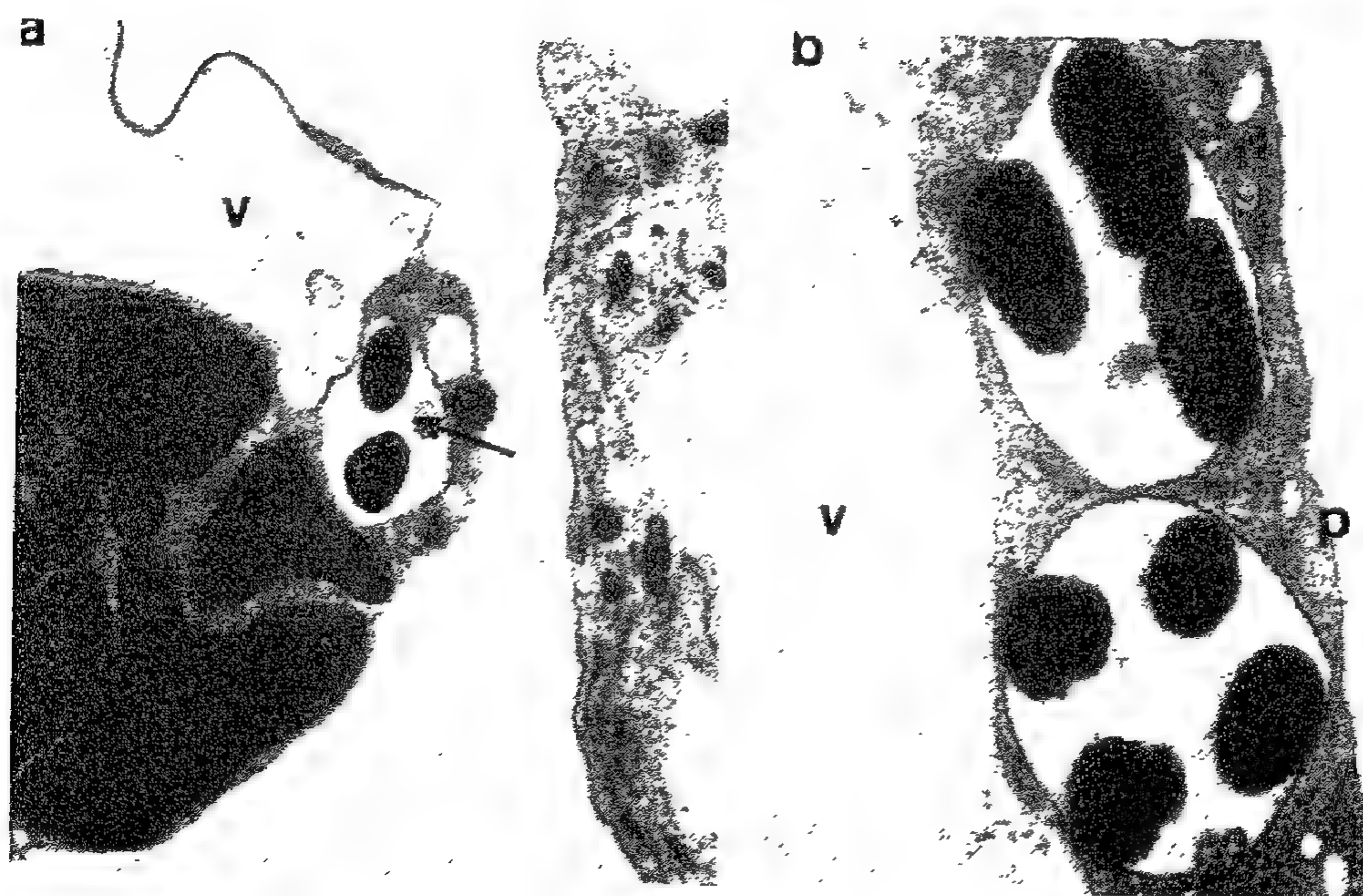
فمثلاً إزالة البشرة السفلى للأوراق لبعض نباتات ذات الفلقتين تكون سهلة مثل نبات التبغ واللوبيا وغيرها. وعلى العكس من ذلك فإن إزالة البشرة لأوراق ذوات الفلقة يكون صعب ولذلك فإن الأوراق يتم تجزئتها إلى قطع شريطية ضيقة قبل غمرها في الإنزيم. بعض الباحثين يضيف لمخلوط الإنزيمين إنزيم محلل للكيوتيكل كوتينيز cutinase لتفادي مشكلة إزالة البشرة تركيز الإنزيم هام حيث أنه متوقف على خواص النسيج وعلى عمر النسيج وعامة فإن تحرير البروتوبلاست يكون أسهل في الخلايا النشيطة النمو. يختلف تركيز الإنزيم باختلاف نوع النسيج ونوع العضو النباتي وعمر النسيج ويمكن معرفة ذلك بالتجربة لكل حالة.

عامة نادراً ما يتحرر البروتوبلاست تماماً من الجدار الخلوي في حالة الخلايا المنزرعة cultured cells باستخدام الإنزيمات المناسبة. يمكن تحرير البروتوبلاست في بعض الحالات بواسطة الطرد المركزي كما هو الحال في بروتوبلاست الميزوفيل.

في بعض الحالات الأخرى فصل وتحرير البروتوبلاست تماماً عن الجدار الخلوي يمثل مشكلة حيث أنهما يظنان ملتصقان أثناء التجربة وأثناء الغسيل كما أن طفوهما سيكون واحد، وفي هذه الحالة يتم غسيل الأجزاء المهضومة على نيلون nylon أو مرشحات صلب غير قابلة للصدأ لها أحجام ثقوب مناسبة للسماح بمرور البروتوبلاست المحرر تماماً وليست الخلايا الغير مهضومة أو المهضومة جزئياً. هذه الطريقة الأخيرة استخدمت بدرجات مختلفة من النجاح لعزل البروتوبلاست المحرر أي العارى من الخلايا وهكذا يمكن الحصول على تحضيرات من البروتوبلاست نقية غير ملوثة بالخلايا.

من الخواص الهامة جداً للبروتوبلاست العارى أن البلازماليم عبارة عن غشاء يمكن أن يكون نتوءات للخارج كما أنه يمكنه تكوين تقعيرات للداخل invaginations. الدراسات بالمجهر الإلكتروني للبروتوبلاست العارى أثبتت حدوث تكوين كثير من الحوصلات في السيتوبلازم. وكل حوصلة محاطة بغشاء مفرد والتي تنشأ في كثير من الحالات من تقعر البلازماليم داخل السيتوبلازم حيث يزداد التقعر ثم يخلق

نتيجة لإلتحام البلازماليمما وتصبح حوصلة بداخل السيتوبلازم. لو حدث تكوين هذه الحويصلات أثناء البلزمة فإنها تسمى *plasmolytic vesicles* ويكون بعضها كبير بدرجة كافية ليأخذ ويحتوى كائنات حية دقيقة. ثبت حدوث ذلك فى عمل بروتوبلاست عارى من خلايا العقد الجذرية فى اللوبيا فإنها تلتقىم البكتيريا *Rhizobium japonicum* والمسئولة عن تثبيت النيتروجين طبيعياً فى العقد الجذرية فى نبات اللوبيا. ويتم عمل ذلك بوضع عدد كبير من خلايا البكتيريا فى مخلوط الإنزيمين أثناء عزل بروتوبلاست ميزوفيل الأوراق ونتيجة ذلك نجد أن البكتيريا توجد فى داخل حوصلات فى السيتوبلازم وفى الشكل (شكل ١٠٧) توجد فى حوصلة خليتين بكتيريا وفى حوصلة ثلاثة خلايا وفى حوصلة أربعة خلايا.



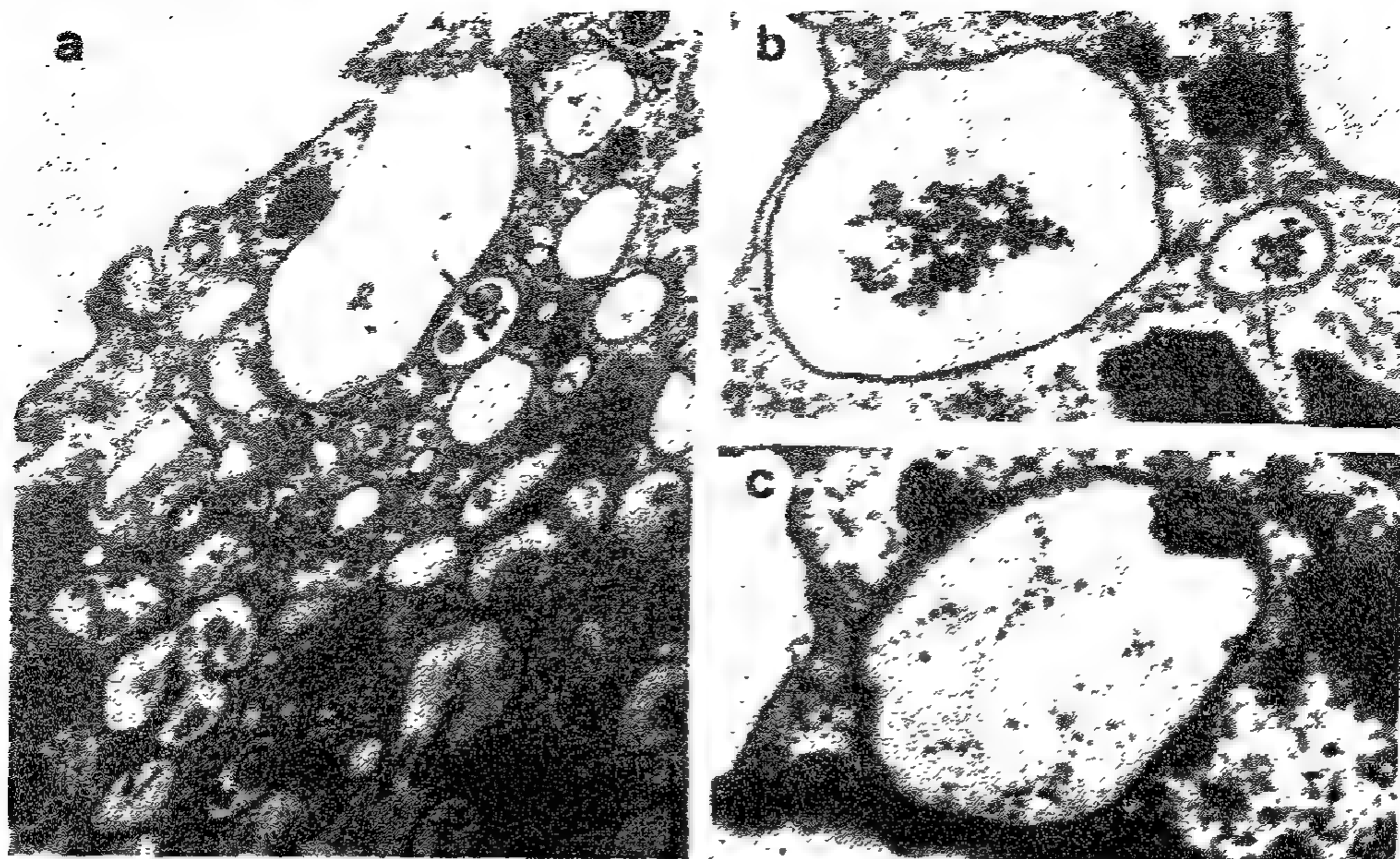
شكل ١٠٧: صورة بالمجهر الإلكتروني لبروتوبلاست عارى من ميزوفيل اللوبيا، (a) حوصلة بها خليتين بكتيريتين من *Rhizobium*، (b) حوصلتين أحدهما بها ثلاثة خلايا بكتيرية والأخرى بها أربعة خلايا بكتيرية أ = بلازماليمما، c = بلاستيدة خضراء، v = فجوة عصارية.



جدر الخلايا البكتيرية تكون مقاومة للإنزيمات التي تحلل جدر خلايا النباتات العادية. عامة البكتيريا يمكن أن تصل للبلازماليمما بعد إختراق جدار خلية النبات الذي تم تحليله جزئياً أو كلياً بالإنزيمات ثم بعد وصول البكتيريا للبلازماليمما وأنه يحدث له تغير للداخل ثم تتكون الحوصلات تحتوى البكتيريا. عامة إنتقام البكتيريا يحدث بسهولة نسبياً نتيجة حركة البكتيريا أى سباحة البكتيريا.

يوجد نوع آخر من الحوصلات يتكون ويكون صغير الحجم عن الحوصلات السابقة ويسمى *pinocytotic vesicles* وينشأ هذا النوع من الحوصلات أثناء إزالة الجدار الخلوى وفى البروتوبلاست الحر العارى. فى خلايا الحيوان تعرف حالة *pinocytosis* بأنها دخول مواد إلى داخل الخلايا عن طريق تغيرات البلازماليمما للداخل. درجة حدوث ذلك فى خلايا النبات غير معروف ولكن من الدراسات على البروتوبلاست الحر أمكن إثبات حدوث هذه الظاهرة. يبدو أن إزالة الجدار الخلوى يشجع نشاط سطح البلازماليمما. وحدث هذه الحالة أى *pinocytosis* يعتمد على نوع البروتوبلاست تحت الدراسة وعلى محتويات وتركيب *plasmolyticum*.

تبدأ هذه الحالة بإدمصاص الجزيء أو الجزء على سطح البلازماليمما ويوجد شحنات على هذا الجزء المدمص يقابله شحنات على غشاء البلازماليمما والعلاقة بينهما تكون حرجة. مركبات عديدة الكاتيونات مثل *poly-L-ornithine* يمكنها تغيير شحنة البلازماليمما وتستخدم أحياناً فى تركيزات منخفضة وهى ١ إلى ٢ ميكروجرام لكل سم<sup>٢</sup> وذلك لتشجيع الإدمصاص والإلتقام. ولإثبات عملية *pinocytosis* فإن البروتوبلاست العارى يحضن فى *plasmolyticum* مناسب محتوى على المواد المطلوب إلتقامها لمدة عدة دقائق إلى عدة ساعات تبعاً لنوع البروتوبلاست والمواد المراد إلتقامها. أمكن إثبات إلتقام كرويات صغيرة من راتنج *polystyrene latex* قطرها حوالى ٠,٣ ميكرومتر وجزيئات ثانى أكسيد الثوريوم *thorium dioxide* وجزيئات عضوية كبيرة الحجم مثل الفيريتين *ferritin* والفيروسات بواسطة البروتوبلاست الحر العارى بواسطة المجهر الإلكتروني (شكل ١٠٨).



شكل ١٠٨: صورة بالمجهر الإلكتروني توضح أخذ إلتقام جزيئات يواسطة حوصلات pinocytotic متكونة في بروتوبلاست عارى من ميزوفيل نبات التبغ. (a) إلتقام جزيئات ثاني أكسيد الثوريوم بواسطة حوصلات موجودة بالبروتوبلاست (مشار إليها بسهم) (b) تكبير لحوصلتين تحتويان أكسيد الثوريوم (x28000)، (c) جزيئات ferritin في حوصلة pinocytotic (x32000).

وهكذا فإن إلتقام مواد أو كائنات حية دقيقة في السيتوبلازم بواسطة الحوصلات حقيقة واقعة في البروتوبلاست الحر العارى. أمكن عمل هذه التجارب بواسطة العناصر المشعة الموجودة في جزيئات كبيرة مثل الأحماض النووية ومنها دنا البكتيريا إ. كولاى وأيضاً رنا الفيروس TMV فيزس تبرقش التبغ وإلتقام الأجزاء السابقة بواسطة البروتوبلاست العارى للنباتات الزهرية. عامة غير معروف بالضبط آلية الدخول في هذه الحالات دنا و رنا فقد تكون إختراق هذه الجزيئات مباشرة للبلاتزماليمما أو أنها تدخل عن طريق الحوصلات ثم تصبح حرة وتحرر في السيتوبلازم. توجد أيضاً أبحاث حول إلتقام الأنوية المعزولة الحرة وأيضاً البلاستيدات الخضراء الحرة المعزولة بواسطة البروتوبلاست العارى للنباتات الزهرية ولكن آلية الإلتقام غير معروفة.



## زراعة بروتوبلاست النباتات الورقية

### The culture of higher plant protoplasts

توجد تجارب مبكرة لزراعة البروتوبلاست على بيئات سائلة أثناء عام ١٩٧٠. حدث تقدم ملموس في ذلك وتم عمله بواسطة Takeba، Labib، Melchers حيث تمكنوا من زراعة بروتوبلاست حر من خلايا ميزوفيل نبات التبغ على بيئة شبه صلبة semi-solid باستخدام ٠,٦% آجار. وهذه الطريقة أصبحت روتينية لزراعة البروتوبلاست الحر من أنسجة عديدة، يتم عمل هذه الطريقة كما يلي:

- يتم عمل معلق من البروتوبلاست العارى في بيئة سائلة مناسبة. يكون تركيز البروتوبلاست الحر العارى في المعلق ضعف التركيز المطلوب في أطباق بترى.

- ثم يتم صب المعلق السابق في أطباق بترى معقمة ثم يصب في هذه الأطباق بعد ذلك كمية متساوية من البيئة التي تحتوى ١,٥% آجار على درجة حرارة ٤٠ درجة مئوية وتضاف بسرعة وبرقة.

- يتم تحريك الطبق لتوزيع البروتوبلاستات العارية داخل الطبق بالتساوى.

- ثم تترك الأطباق بعد ذلك ثابتة لفترة لكي يتصلب الآجار.

- ثم توضع الأطباق في الحضن في الظلام ولكن بعض البروتوبلاست يحتاج إلى إضاءة خافتة وخاصة المأخوذة من ميزوفيل الأوراق. حيث أن الإضاءة الشديدة الزائدة تسبب فساد البروتوبلاست protoplast collapse وفساد الكلوروفيل واختفاء لونه. البيئة في هذه الحالة لابد أن تحتوى مانيتول.

زراعة البروتوبلاست العار بهذه الطريقة يكون غير عميق ولكن لبضع ملليمترات لسهولة التهوية. أما البروتوبلاست العارى يمكن أن يحضن في بيئة سائلة ثابتة دون هز في أطباق بترى أو دوارق صغيرة أو حجرات صغيرة وفي حالة تكون جدران خلوية فإنه يمكن أن يهز برفق ويعامل على أنه معلق خلايا.

إن قدرة البروتوبلاست العارى على تكوين جدار خلوى جديد تكون كبيرة وهذه

الحقيقة معروفة منذ عام ١٨٩٧ حيث تمكن Townsend من إثبات أن البروتوبلاست المبلزم للخلايا السليمة من نبات الألويا ونبات زهرة البطانية *blanket flower* (*Gaillardia lanceolate*) تكون جدار جديد آخر بداخل الجدار السابق. وأن ذلك يحدث في حالة وجود نواة بالخلية أى مرتبط مع وجود النواة.

بعض البروتوبلاست الحر تعيش لمدة ساعات فقط بعد العزل ولكن البعض الآخر يعيش لعدة أيام أو أسابيع قبل الفساد والموت وعلى العكس من ذلك فى بعض النباتات والتي يحدث فيها نشاط للتمثيل الحيوى بدرجة كبيرة أثناء العزل والتي تكون جدار بسرعة ويلى ذلك إنقسام سريع للخلايا وتكوين مستعمرات.

الأنوار الأولى لتخليق جدار جديد يجب دراستها وفحصها بالمجهر الإلكتروني، وهذه الخطوات تحدث بسرعة وتبدأ حدوثها فى خلال بعض ساعات من نقل البروتوبلاست المعزول إلى بيئة زراعة وتنمية، أمكن إثبات ذلك لأول مرة على بروتوبلاست حى معزول من أحد مساكن ثمرة الطماطم وقد تم عمل ذلك بوساطة Cocking ومساعدوه. وتحدث الخطوات فى الحالة الأخيرة وهى نفسها التى تحدث قبل تخليق طبقة السيليلوز وهى عبارة عن تكوين مكون من عديد الطبقات *multilamellar*.

أوضحت الدراسات بعد ذلك أن الجدار الجديد يكون مشابه فى تكوينه للجدار الابتدائى فى الخلايا العادية. إتضح أن تتكون لويقات من السيليلوز على هيئة شبكة تغطى البلازماليمى العارى وذلك فى حوالى اليوم الثالث من الزراعة. لوحظ تكون حوصلات ربما تحتوى مواد جدار الخلية تشق من سطح غشاء البلازماليمى وهى تحتوى مواد غامقة *electron-opaque material* تنشأ من السيتوبلازم. تتخلل هذه الحوصلات لويقات السيليلوز وفى النهاية تختفى، يعتقد لأن محتوياتها تتحد مع الجدار أثناء تكوينه. بعد ٥-١٠ أيام من الزراعة فإن اللويقات تصبح متداخلة بكثافة ويظهر الجدار الجديد.

أحياناً يكون تكوين الجدار غير كامل، تكون النتيجة حدوث تبرعم للبروتوبلاست وبروزه من مناطق الضعف في الجدار. يلاحظ بالمجهر الضوئي تغير البروتوبلاست من شكلها نتيجة للضغط وعادة تلتصق ببعضها. يلاحظ أيضاً حدوث تغيرات أيضاً في داخل البروتوبلاست أثناء الخطوات الأولى المبكرة من تكوين الجدار. زيادة في كمية السيتوبلازم مصحوبة بنشاط في الحركة الإنسايية للسيتوبلازم. تتكاثر البلاستيدات والميتوكوندريا وتتجمع في السيتوبلازم حول النواة. وتتحرك النواة لتتوسط الخلية. يلاحظ زيادة في الريبوسومات والبولى سوم والشبكة الإندوبلازمية والتي تكون خشنة في هذه المرحلة. تختفى الجراتا في البلاستيدات الخضراء تدريجياً وحيث يعاد تشكيلها إلى بلاستيدات النشا مختزنة النشا. وهذه التغيرات تحدث في البروتوبلاست المنماه في الظلام أو الضوء.

ليس من الضروري أن يعقب تخليق الجدار إنقسام الخلية. وفي المزارع لابد أن يحدث تخليق لسيتوبلازم جديد. وفي هذه الأثناء إذا لم يحدث إستعادة النشاط الحيوى المركز regenerated cell في هذه الفترة فإن الخلية المتكونة تفشل في الإنقسام. أحياناً تكون البيئة اللازمة لإعادة تكوين الجدار غير ملائمة لإنقسام الخلايا المتكونة. وفي نفس الشئ فإن إستخدام بيئة تحتوى هورومونات نباتية لازمة لإنقسام الخلايا قد تكون غير مناسبة لإنتاج وإعادة تكوين الجدار لأن الهرمونات تؤثر مباشرة على البلازمالما العارية مسببة تمدد ثم إنفجار وموت البروتوبلاست المعزول. ولذلك فمن المناسب إستخدام بيئة مناسبة لإعادة تكوين الجدار ثم إستخدام بيئة أخرى ثانية مناسبة لإنقسام الخلايا. ولكن في بعض الحالات يمكن أن يحدث تكوين الجدار وإنقسام الخلايا في نفس البيئة.

عادة أول إنقسام للخلية ينتج عنه خليتين بنويتين متساويتين في الحجم. يحدث إنقسام للخلية بتكوين جدار فاصل بين النوايتين المنقسمتين. وفي هذه الحالة فإن الجدار المتكون لأول إنقسام يمكن أن يتكون عبر الفجوة العصارية الكبيرة على هيئة لسان ممتد من السيتوبلازم عبر النواة a tongue-like ingrowth of cytoplasm هذه



الطريقة معروفة لأنها تسمح للخلايا ذات الفجوات العصارية لأن تنقسم فى الخلايا المزروعة cultured cell يحدث بعد ذلك إنقسام للخلايا لتكوين مستعمرات من الخلايا والتي يمكن رؤيتها بالعين المجردة. الخلايا الناتجة من بروتوبلاست أخضر تكون بنية creamy-brown وذلك بعد ٣ أسابيع نمو فى الضوء. يمكن أن تتحول الخلايا تدريجياً إلى اللون الأخضر حيث أن البلاستيدات الخضراء تتشكل مرة أخرى. ولكن بالرغم من حدوث ذلك فإنها لا تصل إلى نفس مستوى التعقيد لأغشية الجرانافى البلاستيدات الخضراء فى الخلايا العادية للورقة أى تكون مختلفة عن الخلايا العادية.

من الأهمية بمكان يجب عمل خفض تدريجى فى الضغط الأسموزى لبيئة الزراعة (لكى يحدث عكس البلزمة de-plasmolysis) وذلك ضرورى للحفاظ على سرعة الإنقسام القصوى للخلايا، وفى عدم حدوث ذلك يحدث للبروتوبلاست فى الخلايا المعاد تكوينها بلزمة ثانوية secondary plasmolysis وتبتعد بعيداً عن الجدار المتكون فى الخلايا المعاد تكوينها. يمكن عمل عكس البلزمة أى الشفاء من البلزمة وذلك بالتخفيف التدريجى فى plasmolyticum.

فى حالة بيئة الآجار، فإن مكعبات من البيئة المحتوية على بروتوبلاست منقسم يتم نقلها لسطح بيئة جديدة ذات نفس المكونات الغذائية ولكن لها ضغط أسموزى منخفض. عند ظهور مستعمرات الخلايا تهر على سطح بيئة الآجار فإنه يمكن الحفاظ على هذه المستعمرات على هيئة كاس بالنقل المستمر على البيئة regular transfer، فى حالة البيئة السائلة تعامل الخلايا الناتجة وكأنها معلق من الخلايا cell suspension culture.

حفظ الخلايا الناتجة من مزارع البروتوبلاست يكون فى بيئة عادية ليس لها ضغط أسموزى.

فى حالة زراعة البروتوبلاست فإنه من المهم أن يكون لدينا تقدير أو فكرة عن كمية البروتوبلاست أى عددها الذى يمكن أن يكون مستعمرة. هذا ما يعرف بالإصلاح

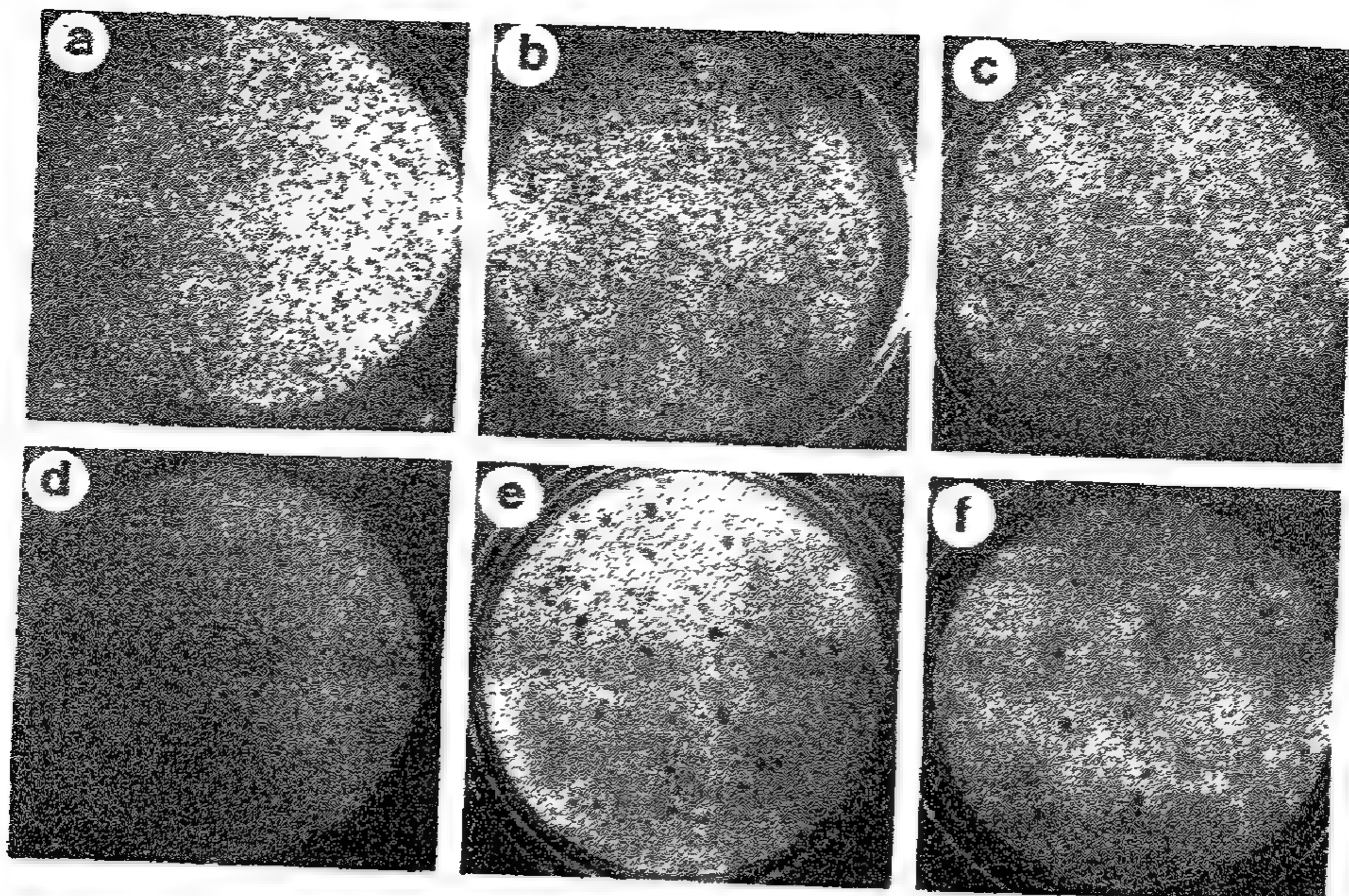


الكفاءة الطبقية plating efficiency أى عدد البروتوبلاست التى تنمو فى طبق بقرى من مجموع عدده البروتوبلاست الموجودة وتحسب كنسبة مئوية. فى حالة بروتوبلاست ميزوفيل أوراق التبغ تكون النسبة مرتبة أى الكفاءة الطبقية مرتفعة وهى ٦٠% ولكن فى نباتات أخرى تكون منخفضة أقل من ٥% عادة.

وعامة لى يحدث نمو للخلايا فإن البروتوبلاست العارى فى أغلب النباتات يجب أن يزرع بتركيز مرتفع plated at high density ويكون مرتفع عن ١٠<sup>٤</sup> بروتوبلاست لكل سم<sup>٢</sup>. ولكن من عيوب هذه الطريقة أن المستعمرات الناتجة تتحدد فى الأطوار المبكرة جداً وبذلك يصعب تحديد عدد الخلايا النامية أو المستعمرة الناتجة من خلية واحدة. عامة يمكن التغلب على ذلك بعمل أقل عدد ممكن من البروتوبلاست ويمكن أن يحدث نمو، وذلك باستخدام طريقة الخلايا الممرضة (من التمريض) nurse tissue أو الخلايا المربية حيث توضع هذه الخلايا الممرضة فى البيئة المشروطة conditioned medium مع وجود الآجار. وهذه الطريقة قام بعملها كل من Ravch، Hunerman، Galun باستخدام خلايا ممرضة لتنشط إنقسام البروتوبلاست أو الخلايا فى كثافة منخفضة أى تركيز منخفض.

وقد وجد هؤلاء العلماء أن معاملة البروتوبلاست بأشعة X-irradiated X فإنها تفشل فى الإنقسام على بيئة الآجار بعد المعاملة ولكنها تعمل كخلايا ممرضة nurse cells وأيضاً تسمى خلايا مغذية feeder cells وأنها تنشط نمو البروتوبلاست الحى. يوضع البروتوبلاست المغذى أى الممرض أى المربى أسفل البروتوبلاست الحى فى الآجار أو يخلط معه. فى بعض تجاربهم استخدموا بروتوبلاست ميزوفيل الورقة فى التبغ ثنائية diploid وعرضوها لأشعة X واستخدمت هذه البروتوبلاست بتركيز مرتفع كطبقة مغذية feeder layer أسفل بروتوبلاست خلايا ميزوفيل الورقة الثنائية أو الأحادية. هذا البروتوبلاست المغذى شجع تكوين المستعمرات فى حالة البروتوبلاست الثنائى فى كثافة منخفضة نسبياً ١٠<sup>٢</sup> بروتوبلاست لكل سم<sup>٢</sup> وفى حالة البروتوبلاست الأحادى كانت أقل كثافة وهى ١٠<sup>٢</sup> بروتوبلاستات لكل سم<sup>٢</sup> (شكل ١٠٩).





شكل ١٠٩: ترجمة توضح أهمية البروتوبلاست الممرض أو المربي أو المغذى. تنشيط تكوين المستعمرات باستخدام كثافة منخفضة low density من بروتوبلاست عارى أحادى من ميزوفيل أوراق التبغ وذلك بواسطة البروتوبلاست المغذى. (a) مقارنة - زراعة بروتوبلاست بتركيز مرتفع  $5 \times 10^4$  بروتوبلاست لكل سم<sup>3</sup>. وبدون وجود بروتوبلاست مغذى. (b, c, d, e, f) بروتوبلاست عارى زرع بتركيزات على التوالي وهى  $10^4$ ،  $5 \times 10^4$ ،  $10^5$ ،  $10^6$  لكل سم<sup>3</sup> على بيئة تحتوى طبقة من البروتوبلاست المغذى تركيزها  $3 \times 10^4$  لكل سم<sup>3</sup> ومعاملة بأشعة X.

الحقيقة قليل نسبياً من مزارع البروتوبلاست تعطى نبات كامل. حيث أن مزارع البروتوبلاست من ميزوفيل الأوراق تنمو وتكون كالكس ومن مزارع الكالكس هذه يتكون منها مجموع خضرى ثم يتكون منه نبات كامل، ولكى يحدث ذلك بكفاءة فى قليل من النباتات مثل التبغ والبيتونيا *Petunia*، السلجم *Brassica napus* rape).

يمكن عمل ذلك أيضاً من بروتوبلاست خلايا البشرة لنبات التبغ ومن السوق المتورقة *caladodes* للأسبرجس وأيضاً من بروتوبلاست خلايا منزرعة للجزر *cultured carrot cells*. حيث أن الكالكس المتكون من البروتوبلاست ينقل إلى بيئة مناسبة لى يحدث *morphogenesis* أى تكوين الساق. هذه السيقان المتكونة يتم تنشيطها لتكوين جذور عرضية ثم تنقل هذه النباتات الصغيرة إلى أصارى تحتوى



سماد معين أو بيئة سمادية معينة potting compost وهكذا تنمو حتى تكوين الأزهار. في حالة نبات التبغ تحتاج الفترة من عزل البروتوبلاست إلى مرحلة الإزهار حوالي ١٠٠ إلى ١٢٠ يوم. وهكذا يمكن من نسيج كالس ناتج من بروتوبلاست واحد أن يكون عديد من السيقان وهكذا فإن عديد من النباتات يمكن أن ينتج من بروتوبلاست من عارى واحد.

### **الشكل الظاهري للبروتوبلاست Protoplast morphology:**

البروتوبلاست المعزول يتأثر بسرعة بالضغط الأسموزي للبيئة المحيطة plasmolyticum عند خفض الضغط الأسموزي بسرعة فإن البروتوبلاست يتمدد وينفجر أو يتمزق البلازماليم وينكمش ويفسد البروتوبلاست collapse. يعقب ذلك عادة طرد الفجوة العصارية والبلاستيدات الخضراء. العكس صحيح في حالة زيادة الضغط الأسموزي في بيئة الضغط الأسموزي plasmolyticum فإن البروتوبلاست ينكمش، وقد يسبب ذلك ضرر للبروتوبلاست وجفاف وقد يسبب بروز البلاستيدات الخضراء من البلازماليم. ولكن البروتوبلاست يمكن أن يتحمل التغيير التدريجي للضغط الأسموزي.

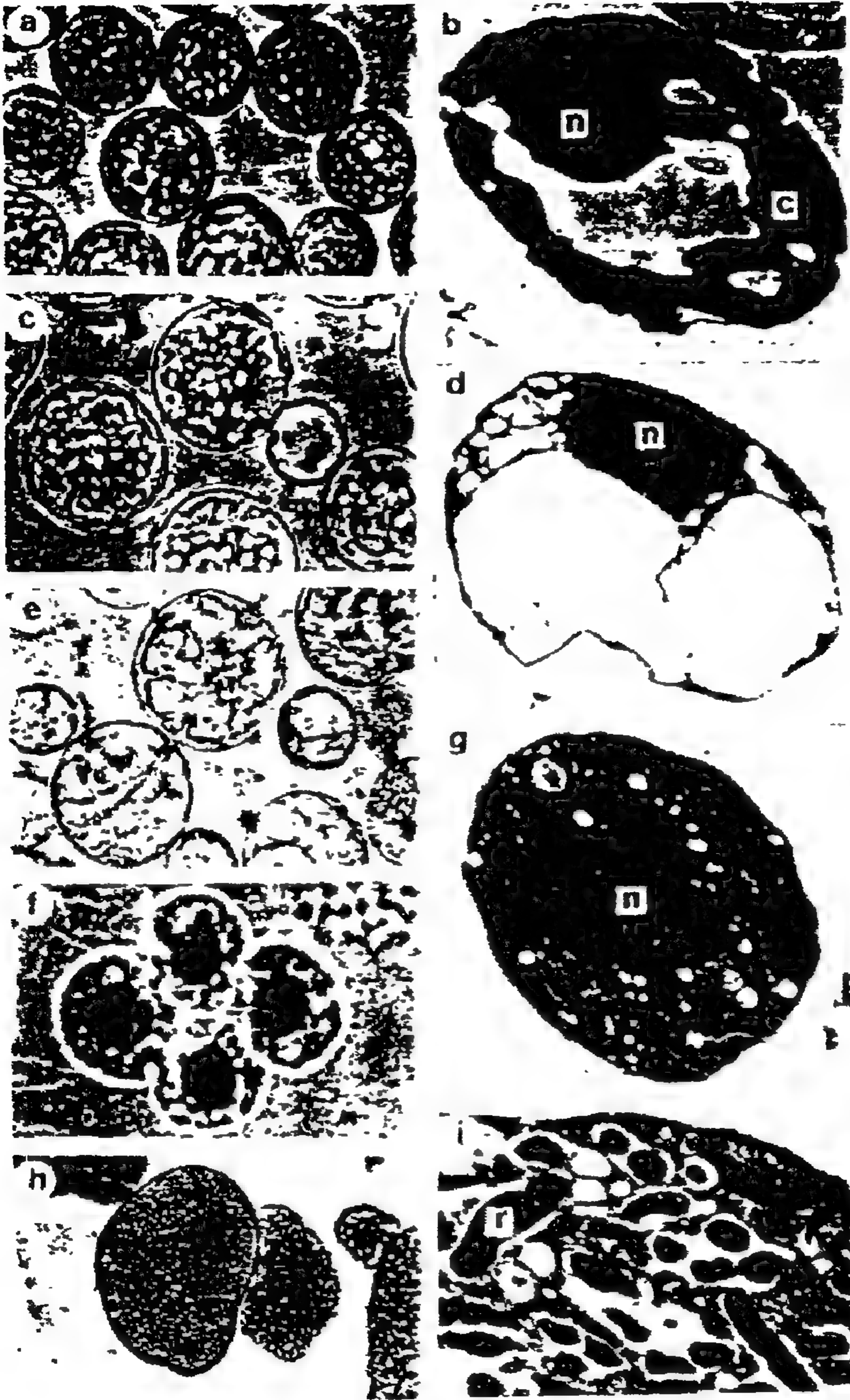
يختلف حجم ومظهر البروتوبلاست العارى تبعاً لمصدره من الخلايا الأم. فإن البروتوبلاست من الأنسجة غير المتماثلة يكون مختلف في شكله الظاهري وذلك بالنسبة لذوات الفلقة وذوات الفلقتين (شكل ١١٠). في حالة بروتوبلاست المتحرر من خلايا ميزوفيل الورقة يكون له فجوة عصارية مركزية كبيرة مع توزيع البلاستيدات الخضراء على محيط السيتوبلازم؟ البروتوبلاست المتحرر من بشرة الورقة يمكن تمييزه عن خلايا الميزوفيل بلونه الأخضر المصفر الباهت وقليل من البلاستيدات وعديد من الأشرطة السيتوبلازمية. بروتوبلاست البتلات يكون ملون بلون الصبغات الموجودة في الفجوة. البروتوبلاست من الخلايا المنزرعة culatred cells يكون لونه كريمي creamy-coloured وإذا وجد نشأ يكون highly



refractive. بروتوبلاست الخلايا ذات الفجوات العصارية يكون قطرها حوالي ٢٥ إلى ٦٠ ميكرومتر، وفي حالة الخلايا المرستيمية والخلايا الأمية لحبوب اللقاح ورباعي حبوب اللقاح تكون أصغر قطرها ١٢-٢٠ ميكرومتر. العكس صحيح في حالة بروتوبلاست الخلايا المصابة من العقد الجذرية يكون القطر ٢٠٠ ميكرومتر أو أكبر. بعكس جميع أنواع البروتوبلاست التي تكون عادة كروية فإن البروتوبلاست العاري للخلايا المصابة في العقد الجذرية يكون متطاوّل بعد إزالة الجدار الخلوي وحيث أن شكلها يتحدد بعدد وتوزيع خلايا البكتيريا bacteroids في السيتوبلازم.

### الشكل الظاهري للبروتوبلاست Protoplast morphology:

يحدث تزاوج بين بروتوبلاست النباتات المتقاربة وراثياً. حيث أن البروتوبلاست المعزول يمكن أن يتزاوج طبيعياً في وجود مركبات تساعد على ذلك مثل بولي إيثيلين جليكول ويسمى فيوزاجين fusagen. عند حدوث تزاوج بين البروتوبلاست فيحدث تزاوج سيتوبلازمي ونووي فتسمى الخلية في هذه الخلية هجين hybrid cell حيث توجد نواه واحدة في البروتوبلاست المتزاوج وقد يحدث تزاوج سيتوبلازمي دون تزاوج نووي ويسمى البروتوبلاست الناتج في هذه الحالة cybrid cell. يحدث عادة عقم للبروتوبلاست المتزاوج وقد ينتج عنه كالس ولا ينتج منه نباتات إطلاقاً. بعد حدوث تزاوج للبروتوبلاست يحدث له إنقسام وأثناء الإنقسام يحدث حالة تلوّ lagging للكروموسوم أو أكثر ونتيجة لذلك فإن البروتوبلاست المنقسم ينتج عنه خلايا ناقصة كروموسوم أو أكثر وخلايا أرى زائدة كروموسوم أو أكثر ولذلك تنتج صفات جديدة نتيجة لوجود هذه الخلايا. يفيد تزاوج البروتوبلاست بين بروتوبلاستين أحاديين من نفس النوع أو الصنف كلا منهما عال المقاومة لمرض معين حيث ينتج عن ذلك بروتوبلاست ثنائي ينتج منه نبات ثنائي diploid شديد المقاومة للمرض.



شكل ١١٠: أنواع البروتوبلاست العارى بالمجهر الضوئى والمجهر الإلكتروني (a-b) من خلايا ميزوفيل التبغ (X450, X2500)، (e) من cultured cell من الجزر (X450)، (f, g) رباعى حبوب اللقاح لنبات التبغ (X1650, X7500)، (h,i) خلايا مصابة فى العقد الجذرية لنبات فول الصويا (X220, X9000) bacteroid خلايا البكتيريا = r، نواة = n بلاستيدة خضراء = c.



ويمكن أيضاً نقل صفات أخرى كثيرة خلاف المقاومة لأمراض النبات. وفي الشكل (شكل ١١٤) ويوجد تزاوج بين بروتوبلاستين أحاديين من ورقتين أحاديتين مختلفتين وينتج من التزاوج خلية ثم تنقسم لتكون كتلة من الخلايا وهذه الكتلة تأخذ الشكل القلبي ثم الشكل الطوريدي ومن هذا الشكل الطوريدي (شبه الجنين embryoid) تتكون الباردة plantlet أو النبات الصغير ثم النبات الكامل. وبعد تزاوج البروتوبلاست توضع على بيئات مختلفة مناسبة وعلى هذه البيئات تحدث المراحل السابق ذكرها من تزاوج البروتوبلاست حتى النبات الصغير وبعد ذلك يزرع هذا النبات الصغير على بيئة مناسبة لإنتاج النبات الكامل.

### **خواص الإختراق والنفاذية لخلايا الثدييات ومنها الإنسان**

#### **Membranes and permeability of mammalian Cells**

تخترق أى تنفذ النيوكليوتيدات إلى داخل الخلية ببطء شديد فى غالبية الخلايا أما عن النيوكليوسيدات والقواعد النووية فإنها تخترق خلايا الثدييات بطريقة تسمى facilitated transport. ومميزات هذه الإنتقال أن هذه المركبات تخترق الغشاء الخارجى للخلية أى تنفذ خلاله بواسطة بروتين ناقل a transport protein غير مرتبط إطلاقاً بالنشاط الطاقى للخلية metabolic energy ولذلك عادة فإن هذا البروتين لا يحدث له تثبيط بواسطة المثبطات metabolic inhibitors.

وحيث أن هذا النوع من الإختراق غير مرتبط إطلاقاً بالطاقة (يختلف تماماً عن النقل النشط المعروف أنه يحتاج طاقة أى يحتاج ATP) فإن هذه المركبات لا تنتقل عكس منحدرات التركيز (فى النقل النشط تنتقل المركبات عكس منحدرات التركيز). والنتيجة النهائية لهذا الإنتقال facilitated فإنه يعمل على تساوى تركيز المركبات الداخلى إلى داخل الخلية والسيتوبلازم مع تركيزها فى خارج الخلية. أما آلية حدوث النقل المسهل facilitated على المستوى الجزيئى فهى غير معروفة بالضبط. ولكن يعتقد أن البروتين يكون tetramer (راجع شرح البروتين فى هذا الكتاب)



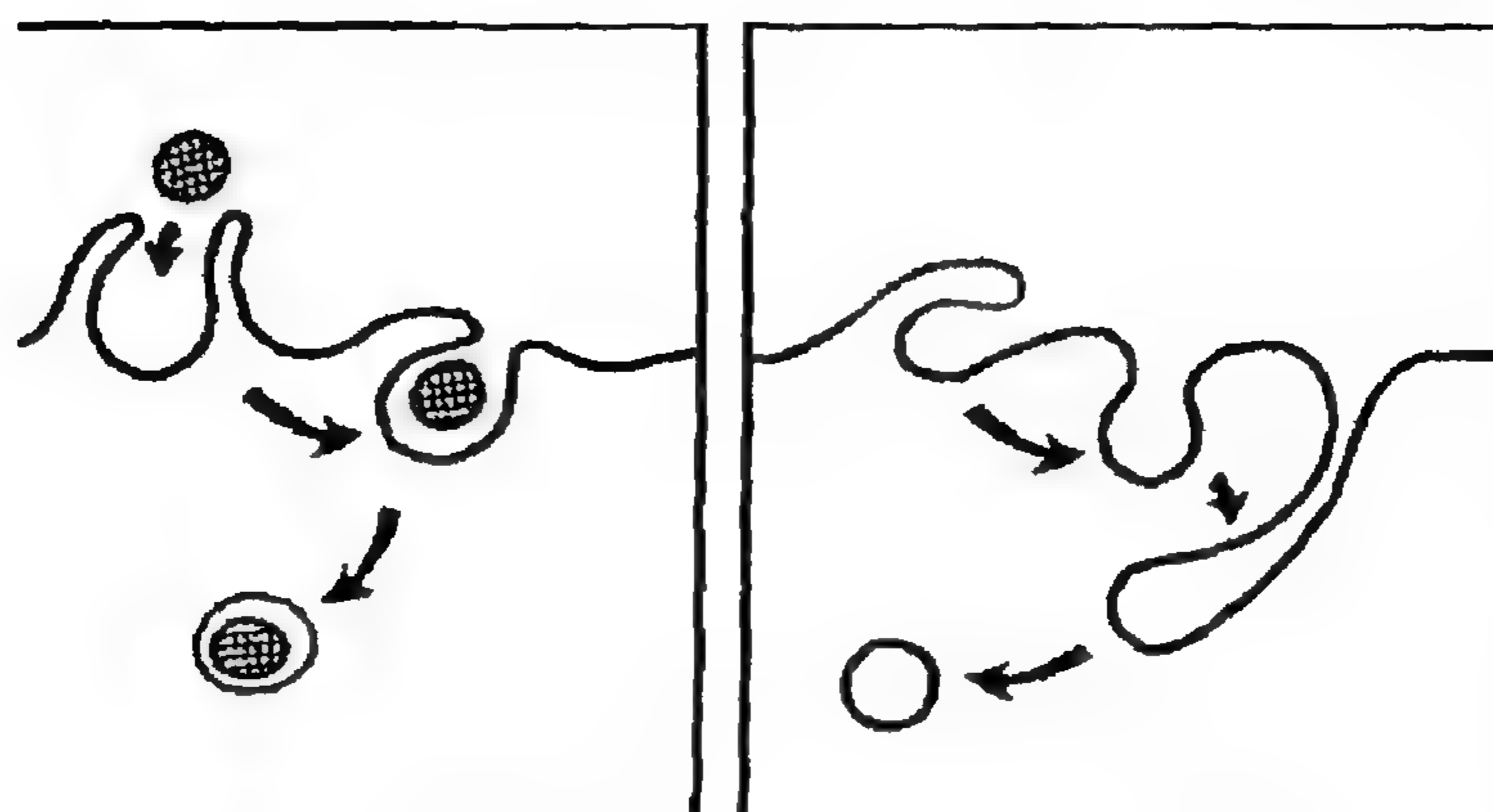
ويخترق أى يتخلل الغشاء البلازمى تماماً وهكذا يكون وصلة بين داخل وخارج الخلية. وتوجد به قناة وسطية وهذا البروتين يلتحم بالمادة النووية ويغير نسبياً من شكلها وتركيبها ليسهل إختراق هذه المادة للقناة الوسيطة وهكذا تخترق الغشاء من الخارج إلى الداخل وتصبح موجودة بداخل الخلية عن طريق إختراقها للقناة الوسيطة. وقد وجد أن هذا النقل المسهل له تجاذب للنوكليوسيدات البيورينية purine nucleosides أكثر من النيكليوسيدات البيريميدينية pyrimidine nucleosides. وجد أن نوكليوسيدات السيتوسين لها جانبية منخفضة جداً لهذا النوع من النقل.

أما حالة النقل المسهل للقواعد النووية فهي أقل وضوح وتمييز. عامة البيورينات تنقل أسرع أى تنفذ أسرع عن البيريميدينيات. والسيتوسين أفقر القواعد فى الإختراق أى أبطنها نفاذية، ويعتقد أن نفاذيته لا يتدخل فيها البروتين الناقل إطلاقاً، يمكن أن يحدث الإختراق فى الخلايا الحيوانية عبر الغشاء وليست خلاله transport across, but not through, membranes وهذه الطريقة تحدث بواسطة ما يسمى endocytosis أى نفاذية المواد إلى داخل الخلية دون المرور خلال الغشاء وذلك بإلتقام المواد والسوائل بطريقة أميبية وتكون حويصلات داخل السيتوبلازم (شكل ١١١).

ويوجد منها ثلاثة أنواع pinocytosis، phagocytosis. الأولى phagocytosis وهى إلتقام ودخول المواد الصلبة أو الشبه صلبة أو الغير سائلة أما الثانية pinocytosis فهى إرتشاف ودخول السوائل والمحاليل. والحالة الثالثة receptor mediated endocytosis وهى تحدث فى أماكن من الغشاء البلازمى خاصة حيث أنها تتميز بأنها مغطاة بهديبات دقيقة bristles.

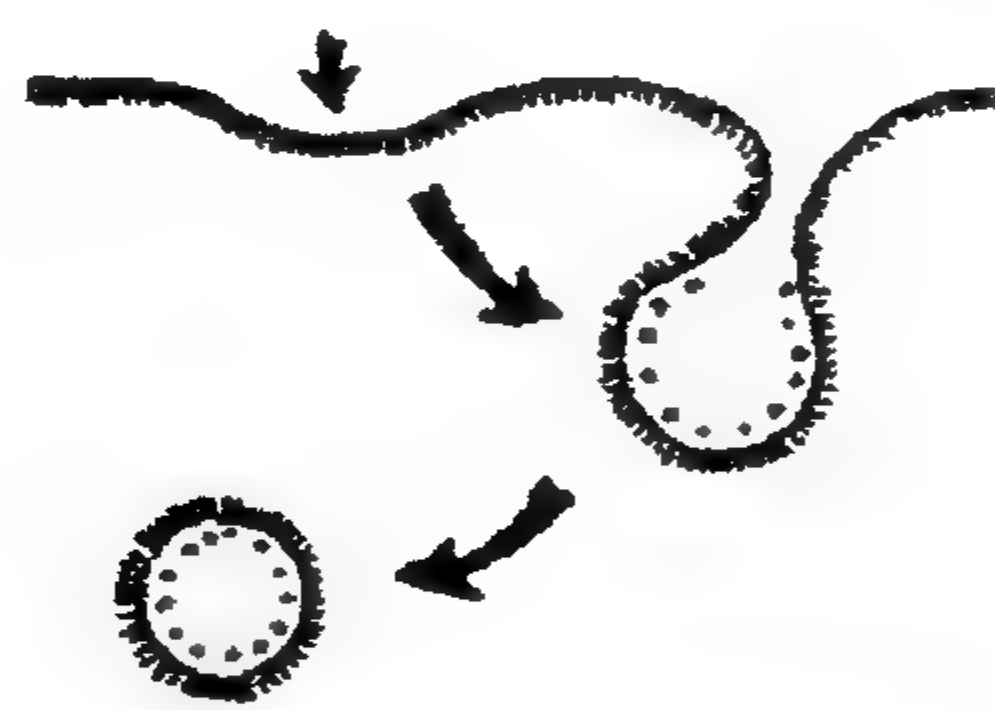
وهذه الهديبات تتكون أساساً من بروتين يسمى كلاثرين clathrin. هذه المناطق المغطاة بهذه الهديبات تسمى النقر المغلفة coated pits ويتكون منها حويصلات تسمى حويصلات مغلفة coated vesicles. وفى حالة إلتقام بروتين بواسطة هذه الحويصلات فإن هذا البروتين يتم التعرف عليه وإلتصاقه بواسطة مستقبل غشائى

متخصص يتكون من البروتينات specific membrane receptor proteins في النقر المغلفة. هذه الحالة receptor mediated endocytosis تحتاج إلى طاقة ولذلك فإنها active process. ومما هو جدير بالذكر أن receptor mediated endocytosis يمكن أن تحدث في مناطق من الغشاء البلازمي لا تحتوي نقر مغلفة.



A Phagocytosis

B pinocytosis



C Receptor-mediated endocytosis

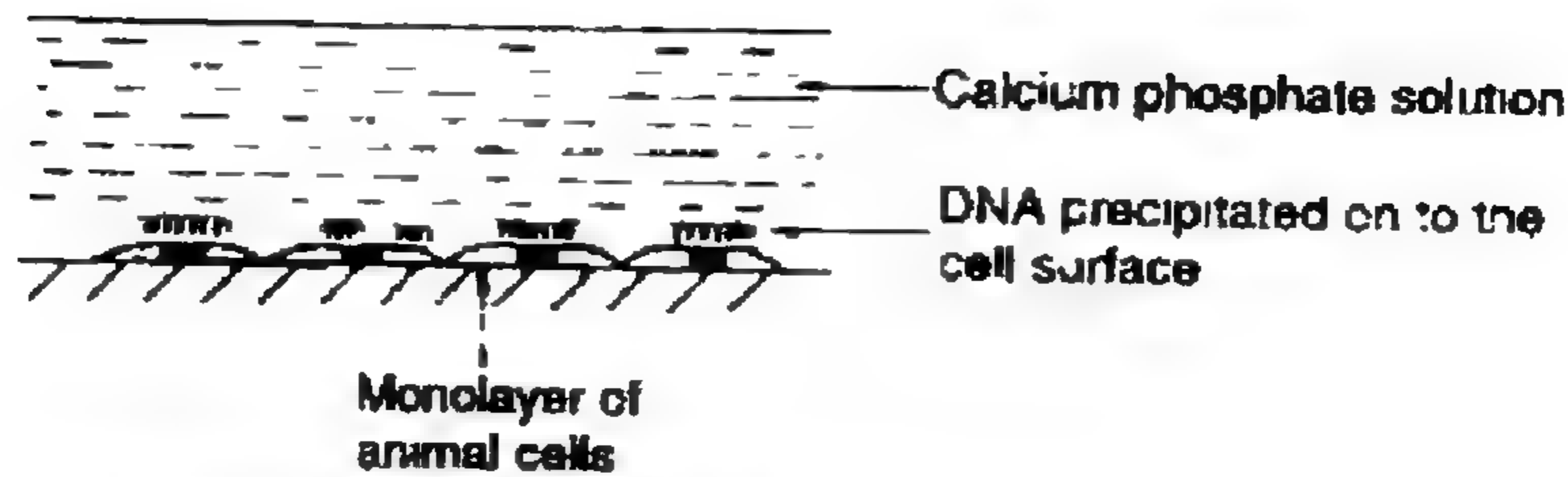
شكل ١١١: الحالات الثلاثة من endocytosis.

### معاملة البروتوبلاست العاري في النباتات والفطريات والخميرة والطحالب:

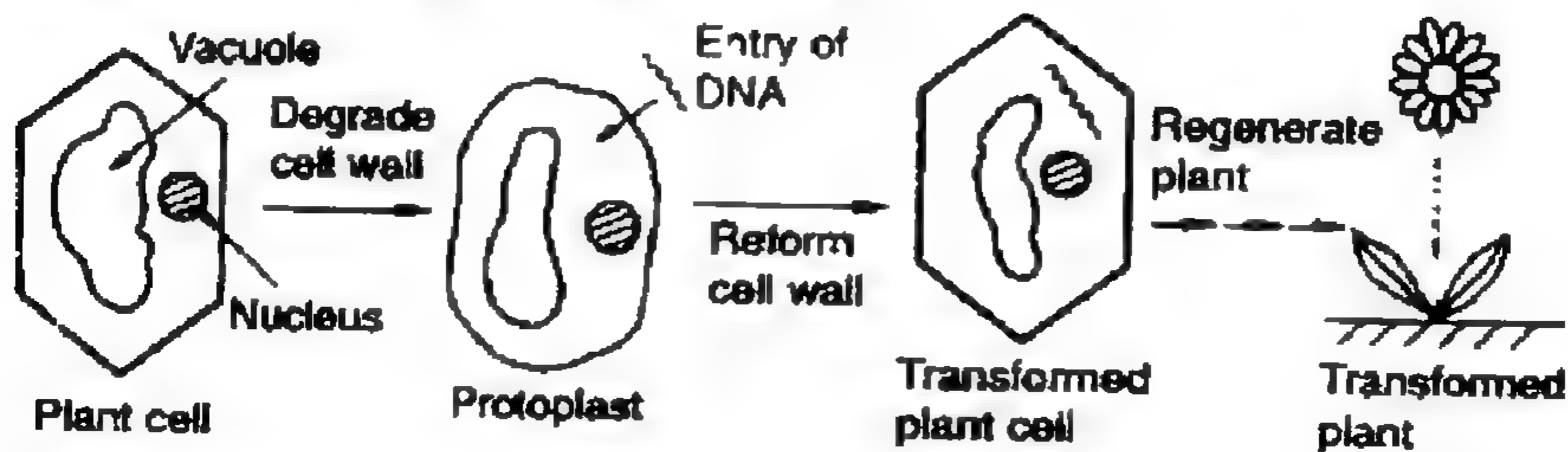
وهكذا بعد الحصول على البروتوبلاست العاري كما سبق شرحه. فإن هذا البروتوبلاست يأخذ دنا و RNA بسهولة ولكن يمكن تنشيط التحول بطرق خاصة مثل الإنفاذ أو التنقيب الكهربائي electroporation حيث يتم تعريض الخلية لصدمات كهربائية قصيرة الزمن تسبب تغيير في سعة الثقوب في غشاء البلازما وخلالها

تمر جزيئات دنا ورنّا، ويلاحظ أن هذه التغيرات في تركيب الغشاء وقتية ثم يعود لطبيعته. بعد التحول يغسل البروتوبلاست لإزالة بقايا الإنزيمات المحللة ثم بعد ذلك تتكون جدر للخلايا مرة أخرى. ومن هذه الخلايا يتم تكوين النبات الكامل (شكل ١١٢) كما سبق شرحه.

(a) Precipitation of DNA on to animal cells



(b) Transformation of plant protoplasts



شكل ١١٢: بعض طرق إدخال دنا على داخل خلايا الحيوان أو النبات، (a) ترسيب فوسفات الكالسيوم على سطح خلية حيوان، (b) تحويل خلية نبات إزالة الجدار الخلوي - ثم تكوين الجدار مرة أخرى ثم تكوين النبات الكامل.

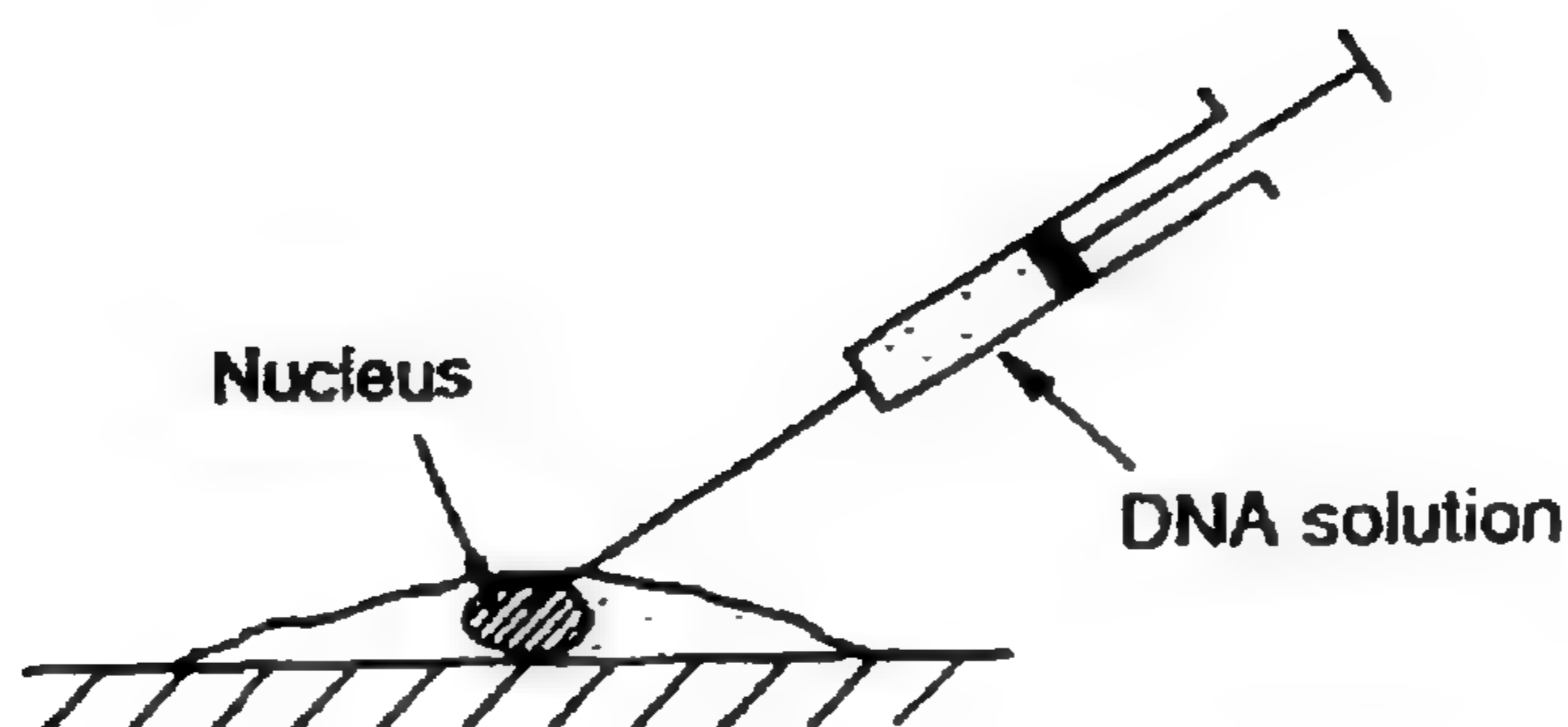
### طرق أخرى غير الطرق الطبيعية تستخدم في إدخال دنا للخلايا:

توجد طرق أخرى غير الطرق الطبيعية السابق شرحها. في الطريقة الأولى، هي الحقن بواسطة حقنة صغيرة (شكل ١١٣، ١١٤) microinjection. ويستخدم في ذلك ماصة دقيقة جداً لحقن جزيئات دنا مباشرة في نواة الخلية (شكل ١١٣). تم تطبيق ذلك في خلايا الحيوان ثم تم تطبيقه على خلايا النبات. أما الطريقة الثانية فهي قذف ضرب الخلايا بواسطة مقذوفات صغيرة microprojectiles عادة عبارة عن

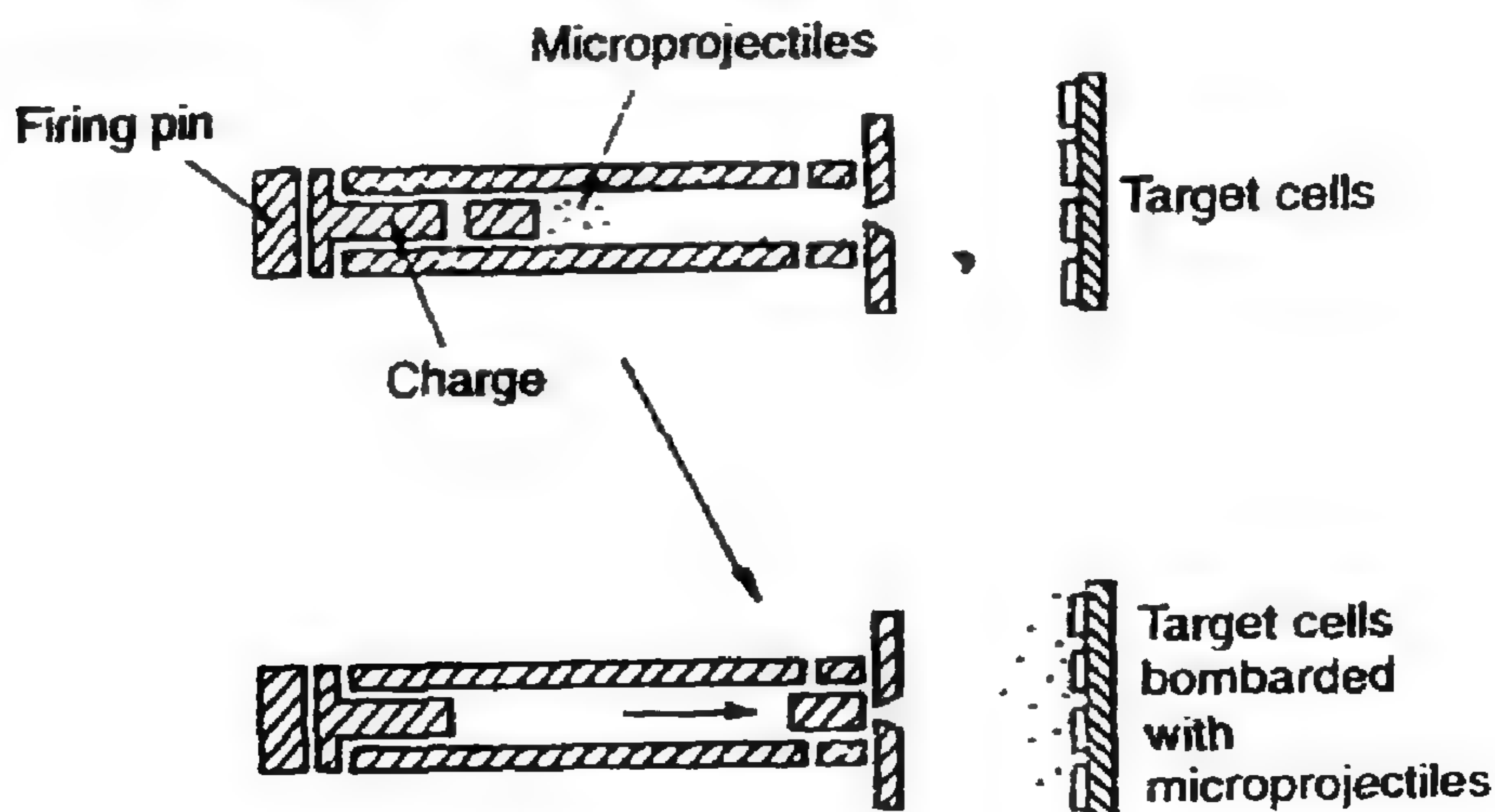


جزيئات ذهب أو تنجستن مغلقة بجزيئات دنا. يتم قذف هذه المقذوفات من بندقية قذف جزيئات particle gun (شكل ١١٣) وتسمى هذه الطريقة biolistics. وتستخدم هذه الطريقة بكثرة ومن أمثل ذلك أجزاء من نبات الذرة من الأوراق حيث يمكن أن يعامل بهذه الطريقة وتعى نتائج هائلة في أوراق نبات الذرة وغيرها كثير من النباتات.

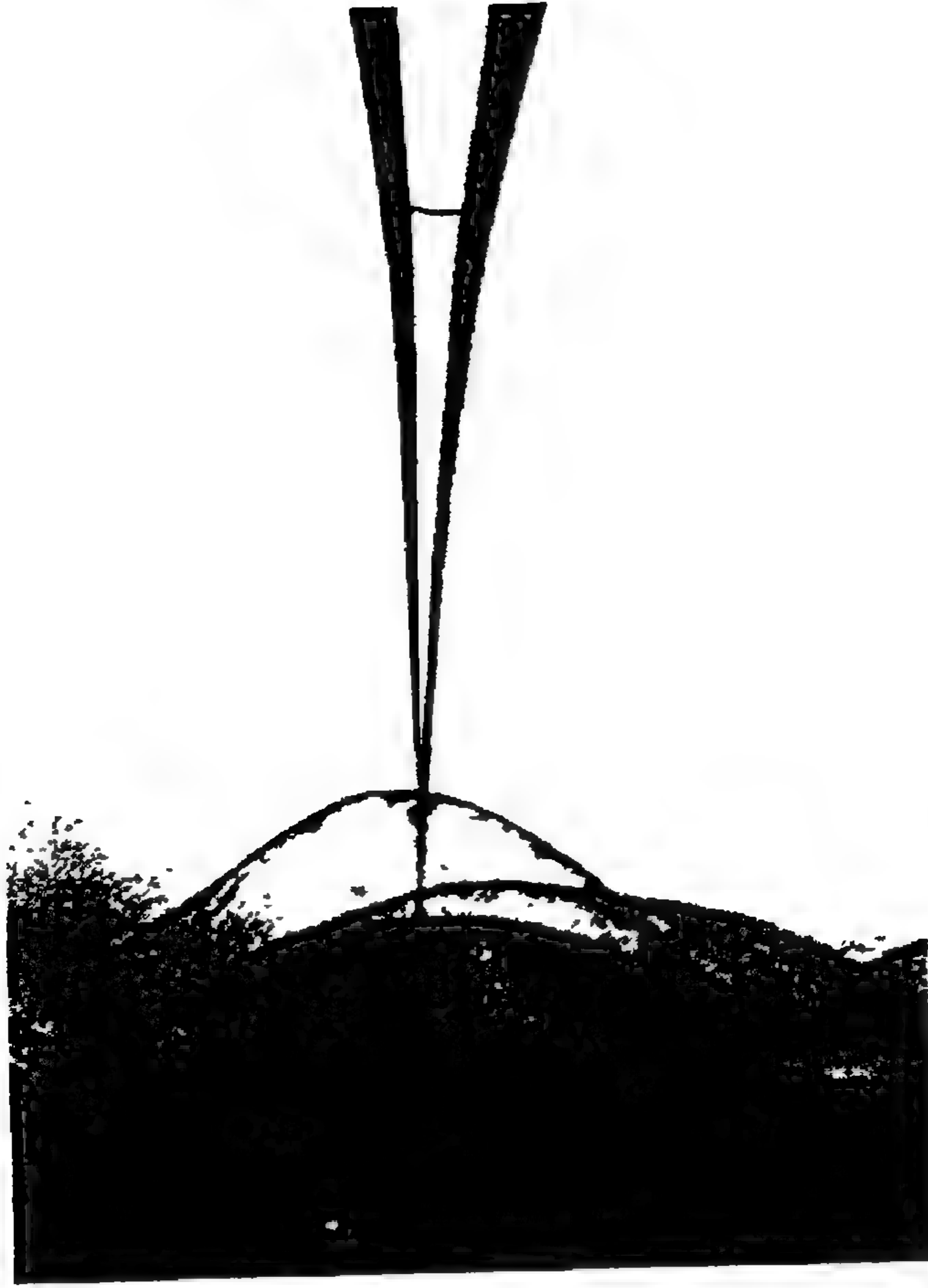
(a) Microinjection



(b) Transformation with microprojectiles



شكل ١١٣ : طريقتين فيزيائيتين لإدخال دنا داخل خلية الحيوان أو النبات هما microprojection and biolistics.



شكل ١١٦: إدخال دنا داخل خلية بشرة نبات (عشب للملوحة halophyte بواسطة micro injection (منظر طبيعي مكبر جدا).

ويمكن إدخال جزيئات معاد صياغتها الجزيئية DNA في الخلايا الحيوانية والإنسان بطرق عديدة وفي إحدى الطرق .. يتم ترسيب جزيئات DNA الأخيرة بفوسفات الكالسيوم الذي تلتقطه الخلايا الحيوانية، ويصبح جزء صغير من DNA الوارد مدمجاً بصورة ثابتة مع DNA الكروموسومي. وتعد كفاءة الإدماج منخفضة، ولكن الطريقة تعد مفيدة، لأنها سهلة التطبيق، وفي طريقة أخرى تحدث بكثرة في خلايا الحيوان والإنسان وبنجاح كبير وذلك بحقن DNA داخل الخلايا، وتستخدم ماصة زجاجية صغيرة ذات طرف دقيق (قطرها ٠,١ ميكرومتر). محتوية على

محلول من دنا معاد صياغته، يحقن داخل النواة في بويضة فأر مخصبة (شكل ١١٤) ويستطيع باحث ماهر أن يحقن مئات الخلايا خلال ساعة من الزمن وتكون حوالي ٢% من خلايا الفئران المحقونة حية. وتحتوى على مورث جديد (شكل ١١٦ ب) من دنا المعاد صياغته. دنا المعاد صياغته يحتوى على جين أو جينات خاصة بهرمون النمو.

### **إستخدام الفيروسات دون الفاج فى نقل المورثات إلى خلايا الحيوان والنبات:**

يمكن إستخدام الفيروسات لإدخال مورثات جديدة داخل الخلايا الحيوانية، وتعد الفيروسات retroviruses (فيروسات RNA المحدث للورم) أكثر الوسيطات الناقلة المؤثرة.

يمكن أيضاً إستخدام الفيروسات التى تصيب النبات لنقل المادة الوراثية كما يلى: يمكن أيضاً أن تستخدم هذه الطريقة فى دراسات على مقاومة الأمراض الفيروسية فى النبات. بالدراسات المكثفة على الفيروسات النباتية كحاملة وناقلة لجينات النبات cloning vehicles H, vectors فإنه فى القريب العاجل يمكن إستعمال بعض الفيروسات النباتية بكفاءة عالية فى هذا الصدد.

يجب الإشارة هنا إلى وجود إختلاف بين الفيروسات الناقلة لجينات النبات plant viral vectors وبين البلازميد Ti، حيث يعتبر البلازميد Ti ناقل وحامل للجين من النوع أو لطراز المكمل أو المتكامل integration-type vector. ولا يعتبر الفيروسات الحاملة والناقلة للجين من هذا النوع. يدخل الفيروس الجين المطلوب نقله إلى داخل النبات حيث أن الفيروس يصيب خلية النبات ويخترقها حاملاً معه الجين المطلوب. يتضاعف الجين فى خلايا النبات بلايين المرات نتيجة لتكاثر الفيروس داخل خلايا النبات بلايين المرات حيث يعتبر الجين أحد جينات جزيئات الفيروس. ونتيجة لذلك ينتقل الفيروس فى جميع أجزاء النبات وبالتالي ينتشر الجين فى جميع أجزاء النبات أى يكون إنتشاره جهازياً systemically.





Micropipet with  
DNA solution

Fertilized  
mouse egg

Holding pipet

شكل ١١٤ أ: حقن بمص دقيق لـ DNA بلازميد منسوخ في مسبق نواة ذكرية لبويضة فأر مخصب.



شكل ١١٤ ب: حقن مورث هرمون النمو في البويضة لفأر مخصبة ينشأ منه فأر عملاق (يسار c وزنه حوالى ضعف أخيه (يمين).

إدخال الجينات المرغوبة إلى داخل النبات وذلك في النباتات الحولية أو المعمرة التي تتكاثر خضرياً بواسطة الفيروس أو في النباتات التي تتكاثر بالبذور وذلك عن طريق حمل البذور للفيروس ويكون نتيجة لذلك تواجد الجين في النبات نتيجة لوجود الفيروس كما أن درجة تكرار الجين في النبات تكون مرتبطة تماماً بسرعة تكاثر الفيروس ودرجة إنتشاره في خلايا وأنسجة النبات المختلفة. يمكن أيضاً إدخال الجين

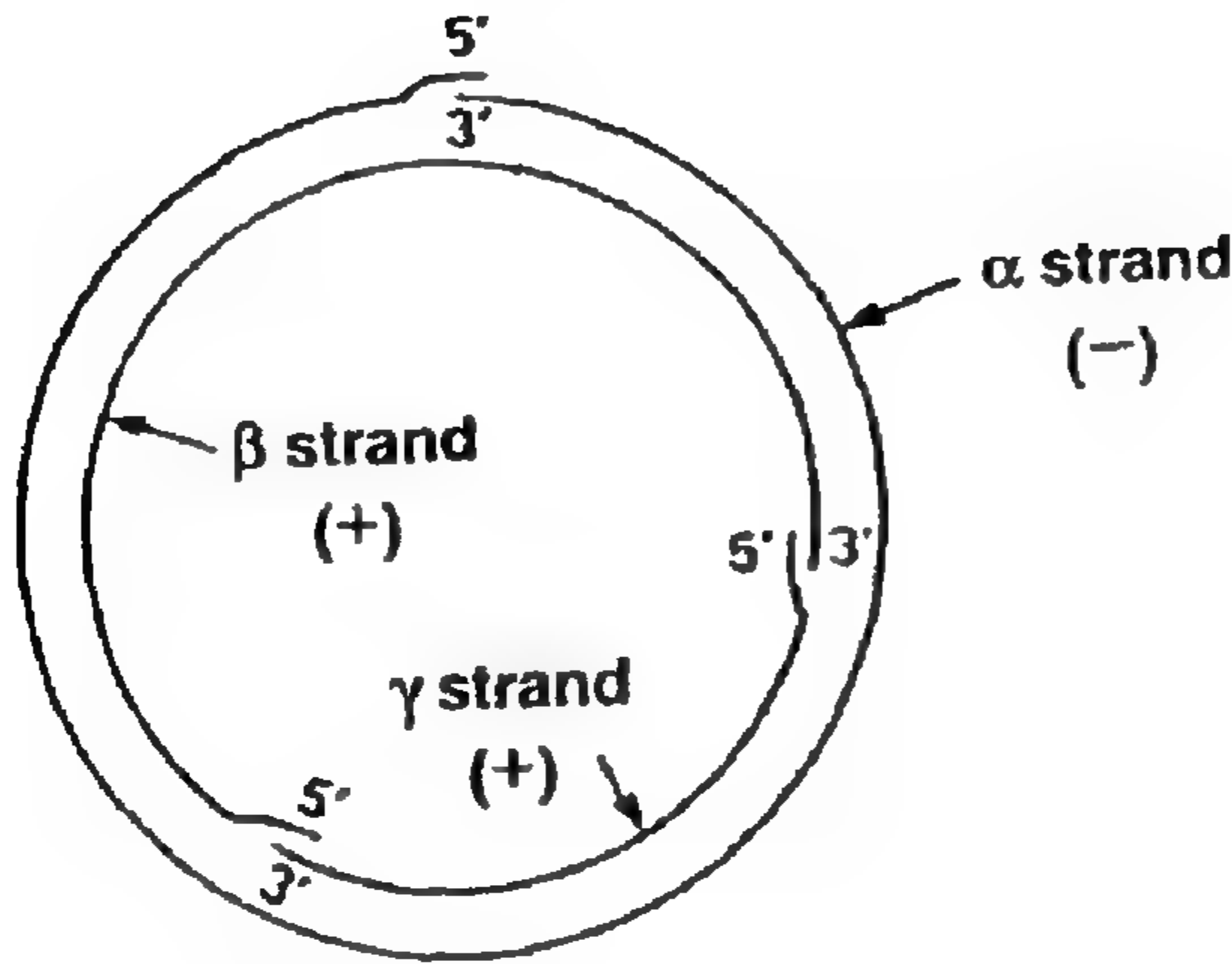
إلى خلايا النبات ومنها النباتات الحولية بواسطة التلقيح الميكانيكي mechanical inoculation حيث يمكن إدخال الفيروس إلى داخل النبات بهذه الطريقة ويمكن إدخال الجين بواسطة الفيروس في النباتات المعمرة بواسطة التطعيم grafting. وفي هذه الحالات فإن الجين المنقول إلى النبات عن طريق الفيروس يمكن أن يسبب أو يظهر مقاومة جهازية ضد أنواع أو سلالات أخرى من الطفيل شديد القدرة على إصابة النبات وبذلك يقي النبات شر الإصابة. طبيعة نوع المقاومة التي يظهرها الجين ليقى النبات من الإصابة غير معروفة ولكن يعتقد أنها نوع من الحماية المختلطة أى الوقاية المتضادة ومن الصعب ترجمة الإصطلاح الدال على هذه الحالة باللغة العربية ولذلك يفضل إستعمال المصطلح الإنجليزي وهو cross protection ومعناه أن وجود الجين بأعداد كثيرة فى داخل خلية النبات يمنع سلالة أخرى من الفيروس شديدة القدرة المرضية على مهاجمة الخلية.

يحدث ذلك بالنسبة لجميع خلايا النبات المحتوية على هذه الجينات وبالتالي تقى هذه الجينات المنقولة بالفيروس خلايا النبات المحتوية على هذه الجينات وبالتالي من الإصابة بالسلالة الشديدة القدرة المرضية. يمكن أيضاً أن تكون طبيعة المقاومة فى هذه الحالة نتيجة للمقاومة الجهازية systemic resistance ولذلك فإنه يعتقد أن تستعمل الفيروسات التى تصيب النبات كحاملات وناقلات للجين المطلوب vectors وأنها تختار وتنتخب بحيث أنها تكون قادرة على إختراق النبات وتتكاثر بداخله دون أن تسبب له أضرار أو نقص فى المحصول وتكون مهندسة وراثياً بحيث أن ما تحمله من جين أو جينات تسبب وقاية خلايا النبات من السلالة المرضية للطفيل. وفيما يلى وصف لبعض الفيروسات النباتية التى يمكن أن تقوم بهذا الدور:

أ - Caulimoviruses وهى عبارة عن فيروسات متساوية الأقطار isometric وقطرها حوالى خمسون نانومتر وتحتوى على DNA ثنائى الشريط أو الخيط حلقى يتكون من حوالى ثمانية آلاف زوج من القواعد النووية. كل خيط أو شريط منهما غير متصل أى متقطع حيث يوجد طرف من خيط على طرف آخر overlaps ويتكرر

ذلك في بعض المناطق وطول الجزء الذي يحدث فيه overlaps حوالي ٦-١٨ زوج من القواعد النووية.

يعتبر فيروس تبرقش القنبيط (CaMV) cauliflower mosaic virus (شكل ١١٦ج) أكثر فيروسات هذه المجموعة دراسة كناقل vector للجين. ينقل الفيروس بسهولة نقل ميكانيكي وذلك بحكه على الأوراق وأيضاً ينقل بواسطة حشرات المن وذلك في نباتات العائلة الصليبية.



شكل ١١٤ج: تركيب DNA فيروس موزايك القنبيط.

كلا من الفيروس و DNA الفيروس المعزول يسبب الإصابة وتكون إصابة جهازية وتحتوى كل خلية من خلايا العائل نصف مليون جزيء فيروس. ينسخ DNA الفيروس نواة خلية النبات العائل وأما mRNA المنسوخ في النواة فإنه ينتقل إلى السيتوبلازم ويتكون منه الشريط السالب (-) من DNA وذلك بواسطة عملية نسخ عكسي reverse transcription ثم يتكون من الشريط السالب شريط آخر موجب (+) من DNA ومنها يتكون DNA الثنائي الشريط أو الخيط. أو أن mRNA يستخدم في تخليق أنواع مختلفة من البروتين من ستة إلى ثمانية أنواع ومنها البروتين الخاص بغلاف الفيروس viral coat protein. لا يدخل DNA الفيروس في تركيب المادة الوراثية للنبات العائل ولا ينقل عن طريق البذور. وبالرغم من إمكانية



نقل ولصق DNA فى بلازميد *E. coli* أى عمل cloning — DNA الفيروس وأن DNA الفيروس يمكن عزله مرة أخرى من خلايا هذه البكتيريا ويكون قادر على إصابة النبات. ولكن حتى الآن لا يمكن إستعمال هذا الفيروس CaMV كحامل وناقل vector للجين أو الجينات حيث توجد عقبات فى ذلك.

وأحد هذه العقبات أن غالبية جينوم الفيروس يجب أن يعبأ مع مناطق الكود coding regions التى يحتاجها الفيروس لتخليقه وحيث أن أى نقص ملحوظ deletion فى هذه الأجزاء يفقد قابلية الفيروس على الإصابة وبالتالي يصبح عديم الفاعلية فى عملية نقل الجينات. أحد مناطق الكود الخاص بالفيروس تتكون من ٤٠٠ زوج من القواعد النووية.

ب - Geminiviruses عبارة عن زوج paired (أى Gemini) من جزيئات الفيروس وكل جزيء يتراوح طول أحد قطريه ١٨-٢٠ نانومتر وطول القطر الآخر ٣٠ نانومتر. كل زوج من جزيئات الفيروس يحتوى جزيء DNA مفرد حلقي ومفرد الشريط أى الخيط single stranded DNA (ssDNA) ويتكون الخيط أى الشريط الواحد من ٢٥٠٠ قاعدة نووية. ولكن عديد من فيروسات هذه المجموعة له جينوم ينقسم إلى جزئين من DNA متساويين فى الحجم ولكنهما يختلفان فى شفرتهما ويكونان مكونات مختلفة coding for different things يبدو أن كل فيروس من فيروسات هذه المجموعة يحتوى على نوعين مختلفين من الجزيئات two populations أى عشيرتين مختلفتين حيث أن العشيرتين تتماثلان فى نوع بروتين الغلاف أو الغطاء coat ولكنهما يختلفان فى تتابع النيكليوتيدات فى DNA. تدخل هذه المجموعة من الفيروسات إلى داخل نواة خلية النبات العائل وتتكاثر بداخلها. تنقل هذه الفيروسات فى الطبيعة بواسطة نطاطات الأوراق أو الذباب الأبيض وتكون من النوع والحالة persistent يمكن أن يصعب أو يستحيل نقلها ميكانيكياً. يعرف القليل عند عدد ونوع وموقع جينات هذه الفيروسات وأيضاً تركيب المحفزات أى المهيئات promoters الخاصة بها.

وبالرغم من أن هذه الفيروسات تكون DNA وحيد الشريط أى الخيط فأنها تكون فى مرحلة وسطية فى النواة لخلايا النبات العائل DNA ثنائية الشريط أى الخيط dsDNA. أمكن عزل هذا النوع الأخير من DNA ويمكن أن يصيب بروتوبلاست خلايا النبات ويمكن أيضاً إدخاله كجزء من بلازميدات خلايا البكتيريا. تصيب الفيروسات التى تتبع هذه المجموعة نباتات ذوات الفلقة وذوات الفلقتين. يوجد أيضاً صعوبات تواجه إستعمال هذه الفيروسات كحاملات وناقلات لجينات النبات vectors ومنها أنها تحتوى على جينومات صغيرة الحجم وأيضاً صعوبة نقلها ميكائياً بواسطة الخلية cell sap. وعامة تبذل مجهودات كبيرة لتسهيل إمكانية إستخدام هذه الفيروسات كناقلات وحاملات لجينات النبات vectors.

**ج - فيروسات RNA (RNA Viruses)** يمكن أن تكون مهمة فى المستقبل وخاصة الفيروسات عديدة المكونات multicomponent viruses ومنها مجموعة بروموفيرس bromovirus ومنها فيرس موزايك البروم brome mosaic virus ومجموعة الفيروسات التابعة satellite viruses وهى فيروسات تلتصق وترتبط بفيروسات أخرى وتسبب الفيروسات التابعة خفض سرعة تكاثر الفيروسات المرتبطة به كما أنها تقلل من قدرته على إصابة النبات هى طفيليات للفيروسات المرتبطة بها.

وقد أمكن فى حالة فيروس موزايك البروم إحلال RNA أو cDNA محل RNA بروتين الغطاء أو الغلاف coat وذلك فى أصغر جزيء من جزيئاته الثلاثة ودون تأثير على قدرة الفيروس على الإصابة. وفى حالة الفيروسات التابعة ورننا التابعة والتى تتراوح أحجامها من ٢٧٠ إلى ١٥٠٠ زوج من القواعد النووية فإن هذه الفيروسات لا تحتاج RNA ويمكن إحلاله كلية أو جزئياً بـ RNA غريب foreign أو حتى بـ cDNA وبالتالي يمكن إدخال هذه الأجزاء الغريبة عن الفيروس إلى داخل خلية النبات العائل عن طريق إصابتها بجزيئات الفيروس. تركيب هذه الفيروسات وإستعمالها كحاملات وناقلات vectors لجينات النبات تحت الدراسة مع وجود احتمالات كبيرة لإنجازها.

الفيروسات Viroids تعتبر جزيئات RNA عارية صغيرة الحجم حلقية وحيدة الشريط أى الخيط ssRNA وتتكون من عدد من الوحدات يتراوح بين ٣٠٠-٤٠٠ قاعدة نووية. تنقل الفيروسات ميكائيكياً وتتكاثر فى نواة خلية العائل وإصابة النبات العائل فيها جهازية. خواص الفيروسات مشجعة جداً لأن تكون ناقلة وحاملة vectors لجينات. النبات وبالرغم من ذلك فإنه حتى الآن لا يوجد أى فرد منها يقوم بذلك. الفيروسات لا تعتبر فيروسات إطلاقاً.

### **إستخدام الليبوسومات Liposomes؛**

تستخدم الليبوسومات فى إدخال دنا أو رنا حتى إدخال أدوية أو غيرها داخل خلية الحيوان أو بروتوبلاست النبات أو الفطريات. يتكون الليبوسوم وهو تركيب صناعى liposome كروى الشكل أو شبه كروى عادة ويكون أجوف فى المركز ويتكون من جدار دهنى يتكون من جزيئات من فوسفوليبيدات مرتبة بجانب بعضها وموجودة فى طبقتين bilayer (شكل ١١٤ د).

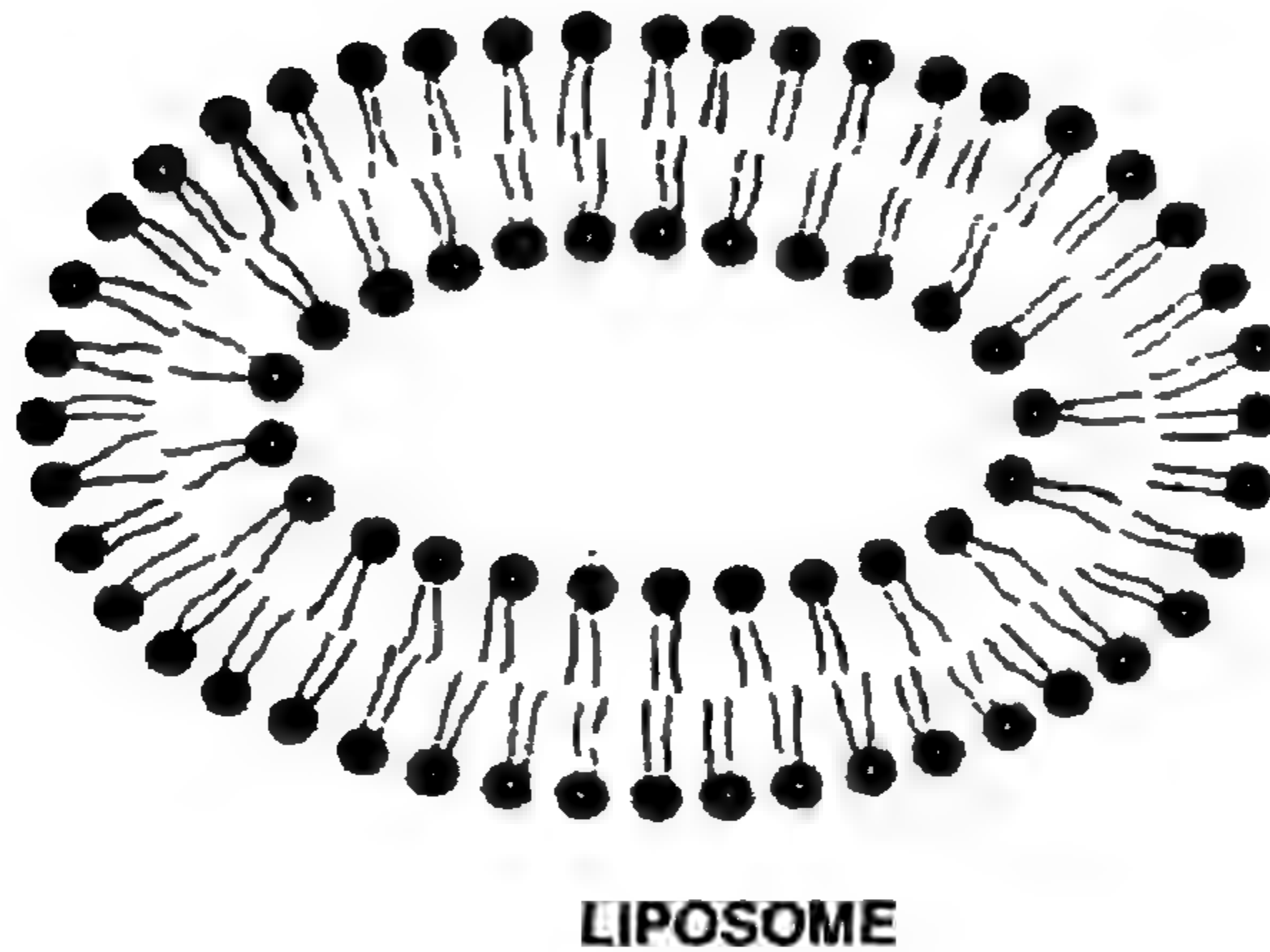
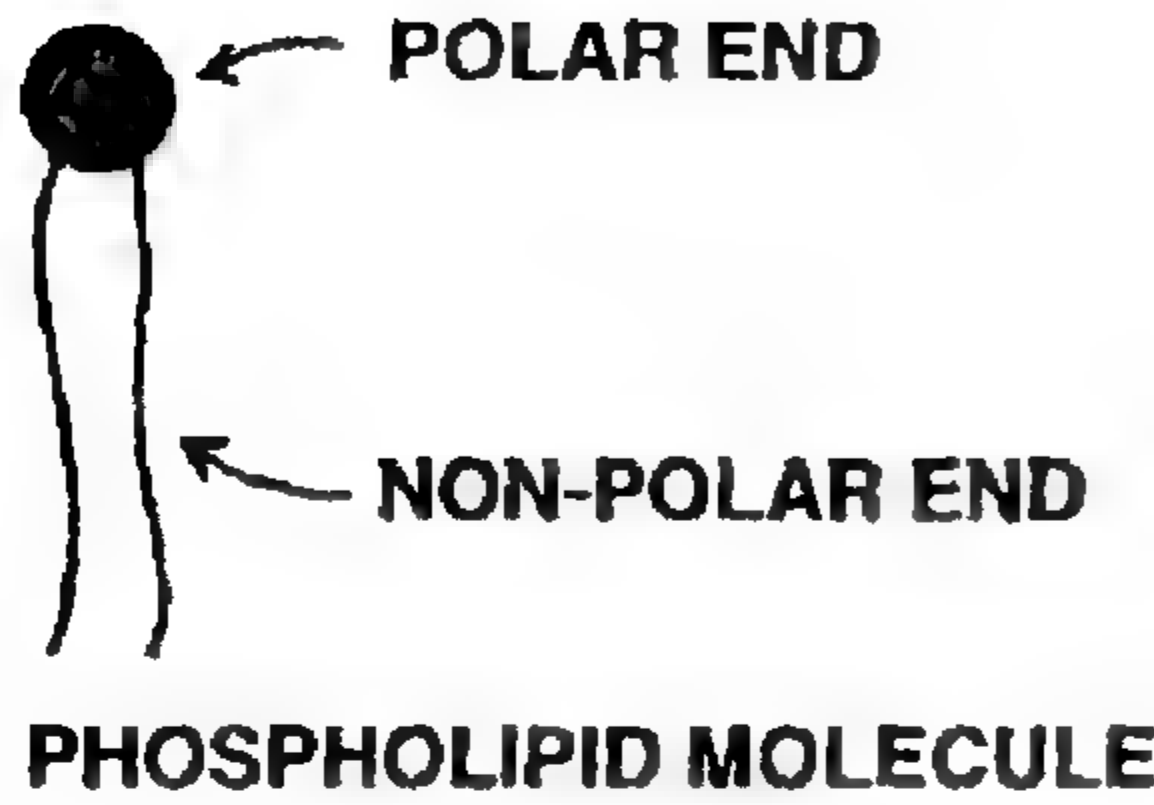
جزيء الفوسفوليبيد الواحد يتكون من رأس كروى قطبى وذيل غير قطبى عبارة عن خيطين. يستخدم الليبوسوم كناقل وسيط متحرك صناعى artificial vehicles لنقل وإدخال دنا أو رنا أو أدوية أو مضادات حيوية داخل خلايا الحيوان وبروتوبلاست النبات والفطريات وغيرها وذلك بعد خلطه معها. يلتصق وينفذ الليبوسوم رنا ودنا بسهولة ويصبح حاوى لها وبعد ذلك ينقله إلى خلية الحيوان أو الإنسان أو بروتوبلاست النبات أو الفطر أو البكتيريا وغيرها من تحضين المخلوط فى الحضان فى درجة حرارة مناسبة وبيئة مناسبة.

### **إستخدام البروتوبلاست الكروى البكتيرى Spheroplast؛**

حيث أن peptidoglycan هو المركب الوحيد الصلب فى جدار خلية البكتيريا. وحيث أن peptidoglycan هو المركب الذى يهاجم ويتحلل بإتزيم الليزوزيم .  
Peptidoglycan the site of attack of the enzyme lysozyme



فإن معالجة خلايا البكتيريا بهذا الإنزيم يسبب تحلل الجدار ويصبح بروتوبلاست خلية البكتيريا حر ويكون دائماً وعادة كروي الشكل سواء خلية البكتيريا كروية أو عضوية أو حلزونية أو واوية الخ.



شكل ١١٤ د: جزئ فوسفوليبيد وليوسوم.

وعامة يسمى الناتج من خلية البكتيريا بعد هذه المعاملة باسم spheroplast حتى مع وجود بعض بقايا وآثار من الجدار عالق بالبروتوبلاست. وهذا البروتوبلاست الكروي البكتيري spheroplast يحتوى بلازميد يحمل جينات غريبة مطلوب نقلها إلى داخل خلية الحيوان أو الإنسان أو بروتوبلاست النبات أو الفطر أو الطحلب. ولذلك يخلط هذا البروتوبلاست الكروي البكتيري مع الخلية أو البروتوبلاست المراد نقل الجين إليه. فيحدث اتحاد مباشر بين الخلية أو البروتوبلاست مع spheroplast وهكذا تنتقل الصفة إلى الخلية أو بروتوبلاست النبات.

### تكوين النبات الكامل أو المحول والحيوان الكامل أو المحول:

فى حالة النباتات الراقية والحيوان نحتاج نبات كامل محول أو حيوان كامل محول وليست خلية واحدة. فى النبات من السهولة بمكان عمل ذلك حيث يمكن تحويل خلية واحدة أو حتى بروتوبلاست ثم زراعتها بطرق زراعة الأنسجة المختلفة حيث يمكن الحصول على نبات كامل محول من هذه الخلية المحولة حيث أنها تنقسم عديد من الإنقسامات لتعطى النبات الكامل المحول كما سبق شرحه ويعطى أزهار وبذور محولة وهكذا يمكن نقل عملية التحويل إلى النسل.

والعكس صحيح فى حالة الحيوان حيث لا يمكن الحصول على حيوان محول من خلية واحدة محولة كما فى النبات ولذلك يتم عمل ذلك بطريقة أخرى حيث يتم إزالة وعزل البيضة من أنسجة الأم ثم يتم حقنها بواسطة دنا المطلوب نقل صفاته لخلية البيضة ثم يتم زراعة البيضة مرة أخرى فى المكان المناسب من الجهاز التناسلى للأم أو لآى أم ويتم عمل هذه الطريقة بكثرة فى الحيوانات الثديية ومنها فئران التجارب وغيرها كثير.

أما عن مولد النعجة دوللى فقد حدث لها ما سبق شرحه دون إدخال دنا للخلية أى أنها الخطوات الأخيرة مما سبق شرحه دون إدخال لدنا فى الخلية ولذلك لا تعتبر حالة النعجة دوللى حالة هندسة وراثية بل تعتبر حالة مزوارع الأنسجة أو حالة هندسة خلوية تم التحضين فيها فى أنسجة أو طبيعية.

فى أواخر عام ١٩٩٦، وفى مزرعة بحثية لعوم الإنتاج الحيوانى بمعهد روزالين بأدنبرة، سكوتلندا بالمملكة المتحدة، ولدت نعجة وولد معها إنباز علمى متميز وبالغ الأهمية فى مجال علم البيولوجى ... هذا الحدث يبشر ويؤكد على كون القرن القادم سوف يشهد ثورة بيولوجية كبيرة. أثار نبأ ولادة النعجة التى أطلق عليها إسم دوللى والذى أعلن عنها لأول مرة فى فبراير ١٩٩٧ دوى هائل فى جميع الأوساط العلمية وغير العلمية فى دول العالم، وثار الجدل بين المتخصصين وغير المتخصصين حول المغزى لهذا الإكتشاف الفريد.

لقد وصف هذا الكشف العلمى من قبل المتخصصون بأنه يعادل فى ماهيته إكتشاف الطاقة الذرية .. لماذا؟ هذا لأن النعجة دوللى لم تنشأ وتتطور من خلال الطريقة التقليدية والمعروفة فى دورة حياة هذا الكائن الحى، والتي تشمل الإكثار الجنسى الذى من خلاله تلتقى خلية أحادية ذكرية مع خلية أحادية أنثوية فينتج الجنين الزيجونى الذى يجمع ما بين صفات الأبوين المشاركين بخلياهما الجنسية. لقد نشأ- وتطورت النعجة دوللى من نواة خلية جسدية فصلت من نعجة وزرعت فى رحم نعجة أخرى. وبذلك فقد حملت النعجة دوللى التركيب الوراثى بجميع الجينات التى يحويه هذا التركيب، بالتالى كانت النعجة دوللى صورة مطابقة فى جميع الصفات للنعجة الأم التى فصلت منها الخلية الجسدية.

وهنا يجب الذكر أن هذا ليس خرقاً لقانون الطبيعة، بل هو تطبيقاً لعقق فهمنا لميكانيكية عمل والأساس البيولوجى الذى يحكم سلوك الخلية التى هى وحدة بناء الكائن الحى. مما لا جدل فيه أن هناك أسباباً قوية ومنطقية وراء التجارب العملية التى تجرى بالمعامل البحثية تحت إشراف العلماء فى المجالات المختلفة .. فم يكن إستنساخ دوللى وليد لفكر علمى أجوق لا يستم بالمنطقية فى محتواه، بل يهدف إلى تطويع العلم والمعرفة من أجل خدمة البشرية والإستفادة من النجاح فى الحد أو على الأقل تخفيف معاناة الجنس البشرى وتوفير حياة أفضل من خلال تسخير هذه المعرفة فى إيجاد مصدر ملائم لتوفير المتطلبات من العقاقير الطبية، تحسين الثروة الحيوانية والمنتجات المتعلقة بها، وغيرها من التطبيقات.

لقد شهدت السنوات القليلة الماضية تقدماً باهراً وملموساً فى مجال علم الهندسة الوراثية، كما انبهرت الشعوب بالقدرات الفائقة التى يمكن أن تتحقق من خلال تطبيقات هذا العلم الحديث العهد، حتى أن أصبح الغالبية العظمى من غير المشتغلون والمهتمون بهذا الفرع من العلم تشير إلى أى تقدم فى مجال البيولوجى إلى علم الهندسة الوراثية؟ وهنا يجب الذكر أنه ليس هناك علاقة ما بين دوللى والهندسة الوراثية بأى صلة من الصلات .. بل يمكن القول أن دوللى هن نتاج الزراعة



والهندسة الخلوية، وهذه قد تكون بدورها النواة لبداية فرعاً جديداً من العلوم البيولوجية. والآن وقد تلمسنا بعض الملامح الأساسية لهذا الكشف العلمي، فإننا نوضح التجربة كاملة .. فى التجربة التى أجراها الفريق البحثى بقيادة العالم إبان ويلموت والتى أثمرت عن النعجة دوللى، أجرى إستخدام تراكيب خلوية مختلفة وفيها تم فصل نواة من خلية جسدية من ضرع نعجة بالغة، ونقلها إلى سيتوبلازم بويضة بعد إزالة النواة الأحادية منها، وهنا يجب الذكر أن هذه البويضة قد فصلت من نعجة أخرى.

ولقد تم إجراء عملية الإندماج لهذه التراكيب الخلوية بواسطة استخدام تقنيات زراعة الأنسجة وتنشيط إندماج الخلايا بواسطة استخدام جهاز مصمم لهذا الغرض يعتمد على إمرار تيار كهربائى فى البيئة التى تحتوى هذه التراكيب من أجل تسهيل تجاوز هذه التراكيب ثم إندماجها معاً. وبعد أن يتم التحقق من نجاح الإندماج بين هذه التراكيب الخلوية، فإنه يتم التأكد من مقدرة الخلية التى تحمل نواة جسدية وسيتوبلازم بويضة على الإنقسام ... ثم يلى هذا زراعة الجنين ذو العدد المحدود من الخلايا فى رحم نعجة أخرى. ولقد تطور الجنين فى الرحم وتشكلت خلاياه وأعضائه فتكونت النعجة دوللى التى أثبتت بما لا جدال فيه مقدرة الخلية الجسدية الحيوانية على تكوين كائن حى كامل دون الحاجة إلى التلقيح والإخصاب. هذا فى معناه يشير إلى أن الخلية الحيوانية تكون قد حققت ما حققته الخلية النباتية منذ سنوات عديدة مضت فى كونها totipotent cell. حقيقة فإن هذا الأمر لم يكن وليداً للصدفة، ولم يكن أيضاً سهلاً فى الحصول عليه .. فلقد أمضى العلماء وقتاً وجهداً كبيراً من أجل تحقيق هذا الهدف.

وتعتبر ولادة دوللى هى الحالة الناجحة الوحيدة فى سلسلة من المحاولات الجادة التى وصل عددها إلى ٢٧٧ محاولة. وهنا نتساءل لما نجحت هذه التجربة؟ وما هى أسباب فشل التجارب الأخرى؟ لقد عرفنا أن مقدرة الخلية الجسدية على تكوين كائن حى كامل تعتمد على قدرتها على التحول من حالة التميز إلى حالة اللاتميز ثم

الدخول فى برنامج جينى جديد. هذا التحول يحدث على المستوى الخلوى فى العديد من المراحل، ويحدث تغيرات جوهريّة خلال هذه المراحل المختلفة فى العمليات الحيويّة التى تجرى بداخل الخلية. من الهام أيضاً الذكر أن هناك العديد من العوامل المتداخلة والمتشابكة التى تؤثر على نجاح تحول الخلية من برنامج إلى برنامج آخر .. هذه العوامل تشمل المرحلة من الدورة الخلوية التى تفصل فيها الخلية الجسدية من أجل إعادة برمجتها إلى البرنامج الجينى، كما تشمل أيضاً المرحلة التى تفصل فيها البويضة من أجل نقل النواة الجسدية إلى السيتوبلازم. ليس هذا فقط بل أن هناك تأثير لبعض المعاملات التى تجرى على التراكيب الخلوية قبل وخلال إجراء الإندماج، كما أن هناك تأثير للتركيب الوراثى، والبيئة المنزرع بها الجينين، وغيرها من العوامل العديدة الأخرى. نظراً لتداخل تأثير هذه العوامل معاً فإنه من الصعب فصل تأثير إحداها عن الأخرى .. هذا فى ذاته يعتبر من المعوقات التى تواجه العلماء الباحثين فى هذا المجال والمهتمين بالبحث عن الأساس الخلوى الذى يتحكم فى هذه الظاهرة. هذه هى الأسباب التى أدت إلى نجاح حالة واحدة ضمن العديد من المحاولات والتجارب العملية للحصول على جنين من خلية جسدية.

ويجب الذكر أن هذا الإكتشاف البيولوجى كان يسبقه العديد من التجارب والمحاولات الخاصة بنقل الأنوية من خلايا متخصصة ورزاعتها فى سيتوبلازم بويضة غير مخصبة .. مما لا شك به أن نتائج هذه التجارب مهدت الطريق لتحقيق النجاح فى الحصول على جنين وكائن حى كاملاً من الخلية الجسدية المنفصلة من نسيج لضرع النعجة.

وبعد نجاح ذلك تم عمل ذلك فى دول أخرى مثل الولايات المتحدة الأمريكية واليابان وتم عمل حيوانات بنفس الفكرة وقد تكون الطريقة محورة عن ذلك إلى حد ما ومن هذه الحيوانات الفئران.

وهكذا فإن التقدم فى زراعة خلية نبات واحدة ويتم عمل نبات كامل منها على بينات صناعية قد تم بنجاح فى الستينيات. ولكن فى الحيوان والإنسان لا بد من

زراعة البويضات المخصبة أو المعاملة بالهندسة الوراثية في أم حاضنة يكبر فيها الجنين وكما سبق شرحه في دوللي. وفيما يلي مثال آخر في الأبقار.

إزالة البيض الزائد من رحم أنثى الأبقار ذات السلالات المتميزة بإنتاج عالي من اللبن ثم يتم تلقيح البيض في المعمل في أنابيب الاختبار في عدم وجود الأنثى أو الذكر أي *in vitro* بواسطة حيوانات منوية من ذكر الأبقار ويكون ذو تركيب وراثي متميز وأن تحمل حيواناته المنوية صفات متميزة وقد يكون لها علاقة بإدرار اللبن. يأخذ البيض الملقح ويوضع أي يزرع Implanted في الجزء المخصص له من الجهاز التناسلي لأنثى أبقار من سلالات تتميز بأنها ذات إدرار لبن منخفض. تكون النتيجة أن هذه الإناث الأخيرة تلد أبقار يمكن أن تكون ذات إدرار عال من اللبن.

### **تكوين النبات الكامل من بروتوبلاست مفرد أو خلية مفردة:**

#### **Generation of an intact plant from one cell or protoplas**

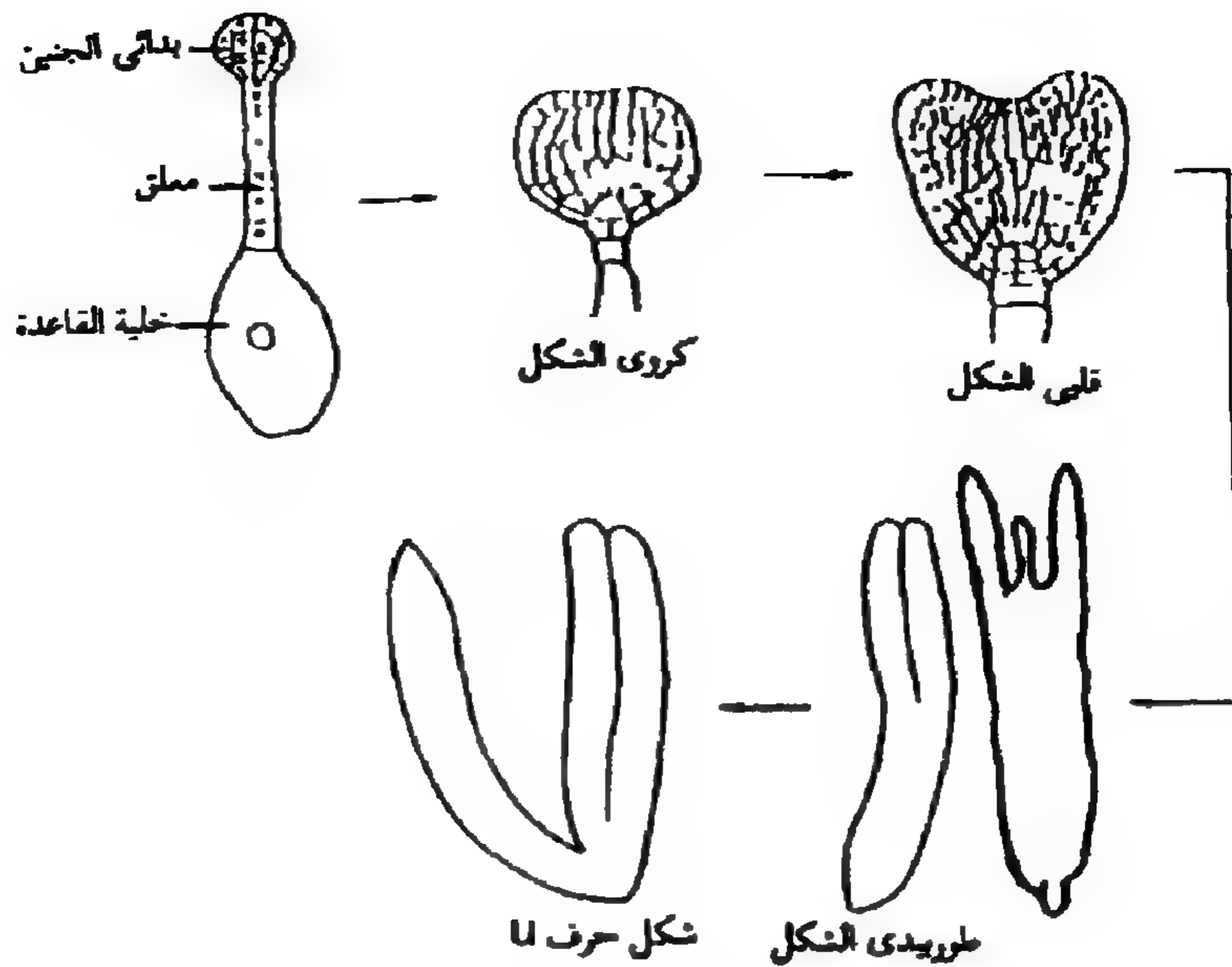
يمكن من البروتوبلاست العاري والذي يكون جدار ليصبح خلية أو من الخلية المفردة أصلاً إنتاج نبات كامل. حيث يزرع البروتوبلاست أو الخلايا المفردة على بيئات خاصة (جدول ٨). ثم ينقل الناتج على بيئات أخرى حتى تكوين النبات الصغير .plantlet

ويحدث على البيئة إنقسام الخلية الناتجة من البروتوبلاست أو الخلية المفردة أصلاً تكون كتلة من الخلايا تتشكل لتكوين شكل قلبي ثم شكل طوربيدي ومن هذا الشكل يتكون النبات الصغير (شكل ١١٤هـ).



جدول ٨: بيئة تستعمل في مزارع البروتوبلاست

التركيز (ملليجرام/لتر)	المكونات
	أملاح معدنية
٧٩٠	كبريتات الأمونيوم
٢٩٠	نترات الكنسيوم
٧٣٠	كبريتات المغنسيوم
٩١٠	كلوريد بوتاسيوم
٨٠	نترات بوتاسيوم
١٨٠٠	نترات صوديوم
٤٥٠	كبريتات صوديوم
٣٢٠	فوسفات صوديوم ثنائية الإيدروجين
١,٥	حامض بوريك
٠,٠٢	كبريتات نحاس
٦	كلوريد المنجنيز
٠,٧٥	يوريد البوتاسيوم
٢,٦	كبريتات الزنك
٠,٠٠١٧	حامض المولبديك
٣,١	كلوريد الحديدك
٨	أثيليت ثنائي الأمين رباعي الخللات الصوديومي EDTA
	فيتامينات وأحماض أمينية
١٠٠	ميسو إينوسيتول meso-inositol
٣	جليسين
٠,١	ثيامين
٠,١	كلوريد البيروكسين
٠,٥	حامض nicotinic
	منظمات النمو
٠,١٥	2,4-D
٠,١٥	كينتين
	مصدر الكربون
٢٠ جرام	سكروز
٢٠ جرام	آجار



شكل ١١٤ هـ: خطوات تكوين النبات الصغير plantlet.

ويكون ذلك على بيئات صناعية معينة في الخطوات المختلفة (الجداول من رقم ٩ إلى رقم ١٦) وذلك لنباتات من المحاصيل مثل الذرة والقمح والفاكهة مثل الموالح والمانجو وللخضر مثل البطاطس والطماطم والزهور ونباتات الزينة مثل البيجونيا.

وفيما يلي طريقة إنتاج نبات تبغ كامل من مزارع حبوب اللقاح ثم من مزارع البروتوبلاست من خلايا ميزوفيل أوراق نبات تبغ أحادية ثم التهجين بين البروتوبلاست الأحادي لتكوين خلية ثنائية ومن هذه الخلية على بيئات يتم تكوين النبات الصغير ثم النبات الكامل وفيما يلي شرح مثال لذلك لنبات تبغ حساس للضوء (شكل ١١٤ و).

### طريقة إنتاج نباتات دخان هجين غير حساسة للضوء بواسطة مزارع الأنسجة

في هذه الطريقة نبدأ بنبات حساس للضوء حيث أنه في درجة الضوء العادي وهي 10000 Lux يكون النبات ضعيف ولا يأخذ اللون الأخضر ويصبح لونه مصفر

أو أخضر باهت ويكون تركيب هذا النبات VV أو SS ثم يؤخذ من أزهار هذا النبات المتك عن طريق الخلايا الأمية لحبوب اللقاح PMS.

ومن هذه الخلايا الأمية لحبوب اللقاح يتكون رباعي حبوب اللقاح ثم يتكون من هذا الرباعي حبوب اللقاح ويتكون من حبة اللقاح على البيئة كتلة من الخلايا تتميز على البيئة إلى شبه جنين قلبى الشكل ثم طوربيدى الشكل ومن هذا يتكون النبات الصغير وتركيبه V أو S وهذا النبات الصغير يكون haploid أحادى الأساس الكرموسومى أى أنه V أو S وليس VV أو SS لأنه ناتج من حبوب اللقاح ويتكون هذا النبات من نسيج الكالس.

ثم يؤخذ هذا النبات الصغير الأحادى الأساس الكروموسومى وينمى فى درجة ضعيفة من الإضاءة وهى 800 Lux حيث تصبح البادرة والنبات المتكون فى الإضاءة الضعيفة ولأنه حساس للضوء يكون اللون الأخضر العادى وهذه حالة طريقة وهى حالة عكسية لما هو شائع فى جميع النباتات حيث أن جميع النباتات العادية فى وجود الإضاءة العادية يكون لونها أخضر وفى حالة الإضاءة الضعيفة يحدث لها شحوب ضوئى وتصبح خضراء باهتة أو مصفرة ولكن العكس صحيح فى هذه الحالة لأننا بدأنا بالنباتات الحساسة للضوء حيث أنه فى درجة الإضاءة العادية تكون خضراء باعثة وفى درجة الإضاءة المنخفضة تكون خضراء عادية اللون.

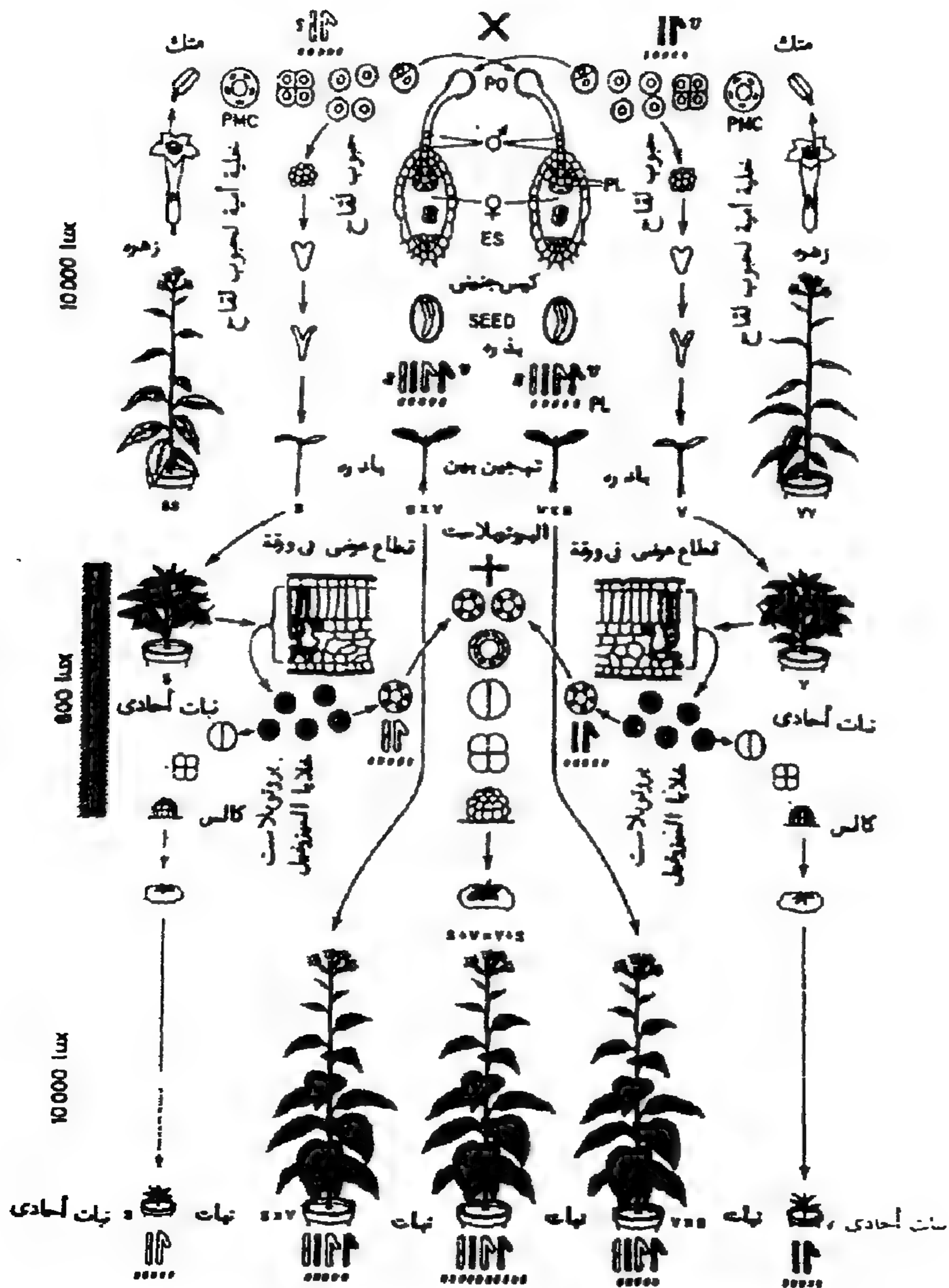
ومن هذه النباتات يؤخذ جزء من نسيج الورقة ومن الخلايا الكلورانشيمية لنسيج الورقة يؤخذ البروتوبلاست أى يتم عمل مزارع البروتوبلاست على بيئة مناسبة (جدول ٨) ثم يحدث التزاوج بين البروتوبلاست xV البروتوبلاست S ليتكون كتلة من الخلايا ونسيج كالس ويتكون نبات هجين SV heterozygous ولأن هذا النبات غير متمثل أى خليط فى تركيبه الوراثى heterozygous يتميز بأنه نبات عادى.

ففى درجة الإضاءة العادية وهى 10000 Lux يكون نبات عادى وذلك عكس الأبوين VV، SS حيث أن كل من الأبوين homozygous متمثل التركيب الوراثى.



بالفعل عندما أجرى تنمية البروتوبلاست فقط دون تزاوج فقد نتج نبات أحادي haploid من مزارع البروتوبلاست تركيبه V أو S ويكون هذا النبات ضعيف مصفر لأنه حساس للضوء العادي (شكل ١١٤) وهكذا يمكن إنتاج نبات خليط في تركيبه الوراثي بالتهجين العادي وبمزارع الأنسجة.

سبق ذكر الكالس وسيلى ذكر مزارع الكالس وفيما يلي ملخص عن ذلك.



شكل ١١٤: التهجين في نبات التبغ وإستعمال مزارع الأنسجة.

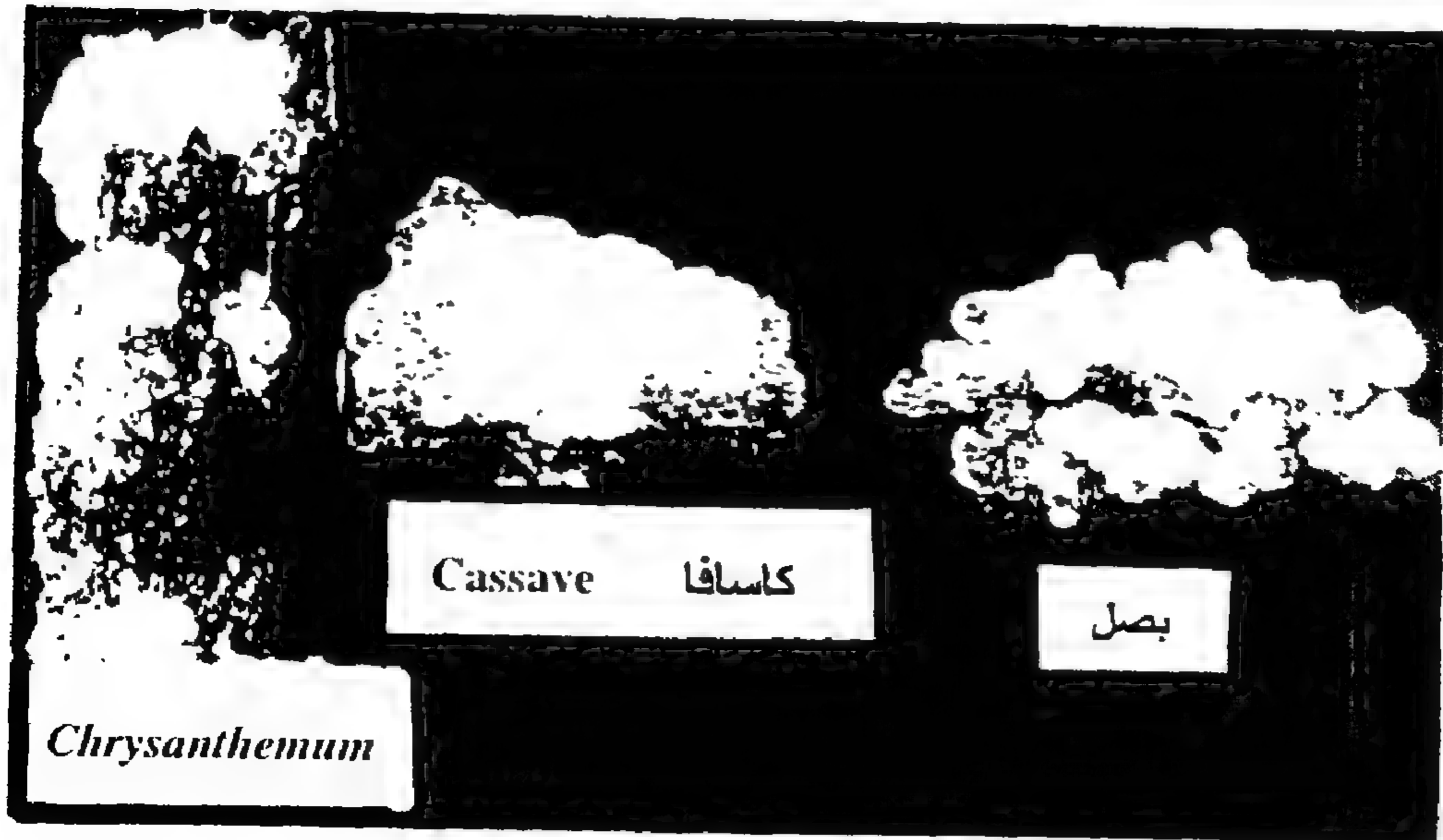
## مزارع الكالس

## Callus Culture

## تعريف الكالس Callus :

هو عبارة عن كتلة من خلايا رقيقة الجدر *disorganized cells* يتخللها خلايا مرستيمية قد تكون هذه الخلايا المرستيمية على سطح نسيج الكالس كما فى نبات الشقيق وقد تكون فى داخل نسيج الكالس كما فى الكلس الناتج من الساق القرصية للبصل وقد يكون نسيج الكلس هش وقد يكون صلب وقد يكون أملس وقد يكون ذو نتوءات وفى حالة وجد الضوء فإنه يمكن أن تتكون فى الخلايا بلاستيدات خضراء وتصبح خلايا كلورانشيمية. (شكل ١١٤ ك).

وفى حالة المعاملة بمركبات معينة مثل منظمات النمو يمكن أن تتميز خلايا نسيج الكلس إلى اللحاء والخشب. وفى بعض الحالات قد يتكون فى نسيج الكلس وفى داخل الخلايا فجوات عصارية ملونة ويصبح الكلس ملون وذلك كما فى نبات *Haplopappus* وحيث ينتج الكلس من بتلات الأزهار لهذا النبات وأن هذه البتلات تكون ملونة. وهذه الصبغات الملونة عبارة عن صبغة الأنثوسيانين *anthocyanine*.



شكل ١١٤ ك: نسيج الكلس فى نباتات مختلفة.

### بعض الصفات الخاصة لنسيج الكلس:

يمكن أن يستعمل نسيج الكلس فى مزارع الأنسجة فى إنتاج نباتات أو أجزاء أو أعضاء نباتية ولكن من المعروف أن نسيج الكلس فى حالات كثيرة يكون غير ثابت من ناحية التركيب الكروموسومى أى من الناحية الوراثية حيث أنه كثيراً ما نجد فى نسيج الكلس خلايا تختلف فى عدد الكروموسومات ويوجد أيضاً فى بعض الخلايا حالات chromosomal aberrations ومنها التضاعف duplication والنقص deletion والإقلاب inversion والانتقال translocation وحالات أخرى وهى التضاعف aneuploidy و polyploidy وهى التضاعف فى عدد الكروموسومات أو قلة وزيادة الكروموسومات حيث نجد أن الخلية الثنائية تصبح رباعية وقد تصبح سداسية.

أما فى حالات التضاعف aneuploidy الناقص فتتشأ حالات مختلفة منها على سبيل المثال وليس على سبيل الحصر حالات نقص كروموسوم واحد  $2n-1$  monosomic ونقص ٢ كروموسوم  $2n-2$  nullisomic وقد يزيد النقص  $2n-3$  و  $2n-4$  وهكذا وقد يزيد عدد الكروموسومات واحد ويسمى  $2n+1$  trisomic وقد يزيد عن ذلك ولذلك فإن جميع هذه الاختلافات فى أنواع الخلايا توجد فى نسيج الكلس.

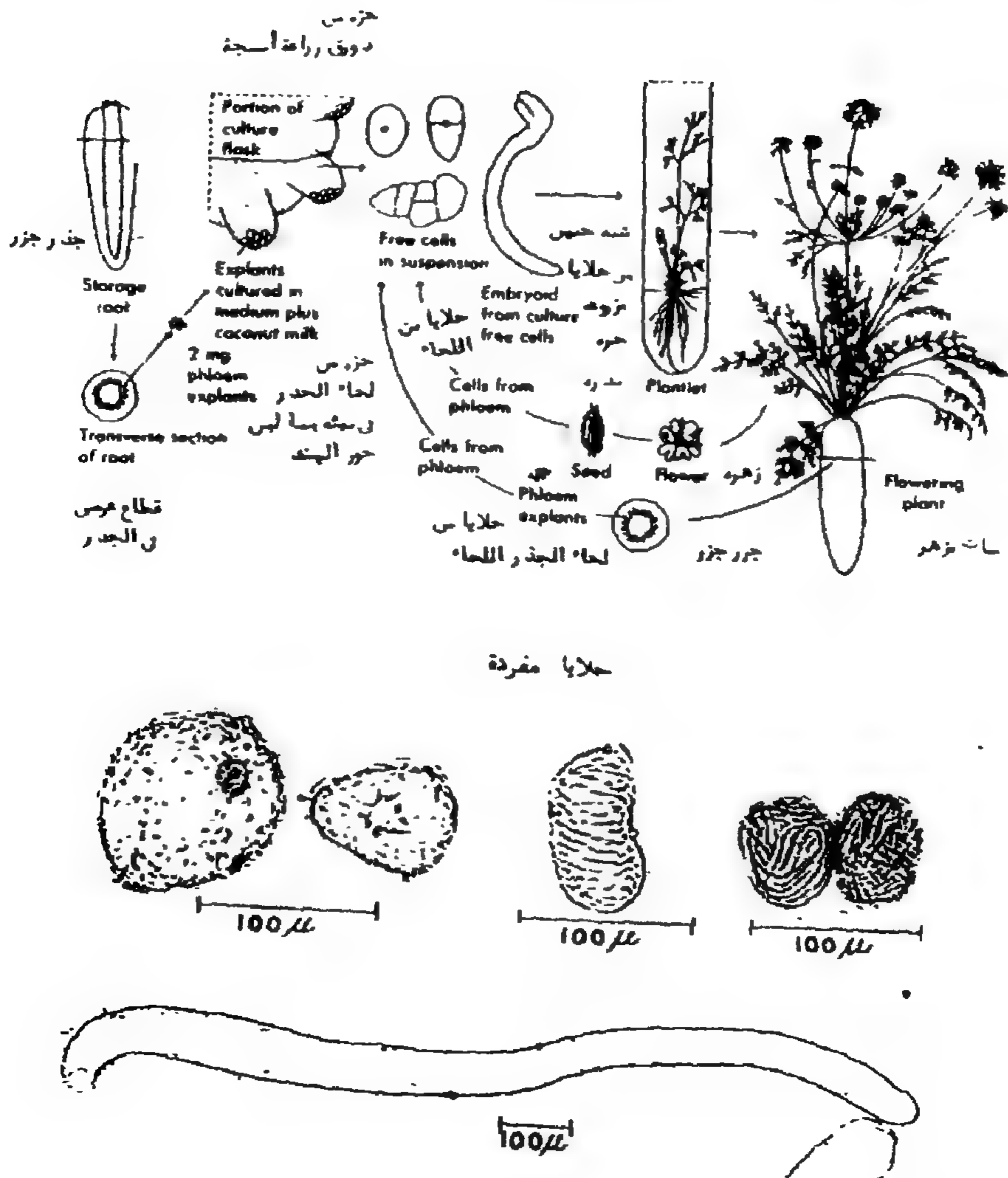
ولذلك لا يفضل فى بعض الأحيان استخدام الكالس فى إنتاج نباتات جديدة لإختلافه الكبير فى التركيب الوراثى فى الخلايا المكونة لهذا النسيج.

### إنتاج نباتات من نسيج الكالس

تستعمل هذه الطريقة بكثرة فى إنتاج بعض النباتات ومثال لذلك إنتاج نبات الجزر من جزء من جذر النبات حيث يتم قطع الجذر ويؤخذ جزء صغير من داخل الجذر ويوضع على بيئة مناسبة فيتكون نسيج الكالس من هذا الجزء من الجذر. ويؤخذ نسيج الكالس ويوضع فى جهاز يشبه جهاز الطرد المركزى أو يوضع فى دوارق



مخروطية ويعرض لهز مستمر على الـ shaker فينتج عن ذلك تفتت نسيج الكالس أو أجزاء منه ويكون ذلك في محلول مناسب وبذلك يتكون معلق suspension به مجاميع من خلايا الكالس أو خلايا مفردة وعند زراعة مجاميع من هذه الخلايا على بيئة مناسبة فإنها تكون شبه الجنين القلبي ثم شبه الجنين الطوريدي ثم يتكون من الأخير النبات الصغير plantlet (شكل ١٤ ز). ومنه يتكون النبات البالغ ومن ذلك يتضح إنه يمكن عمل دورة الحياة لنبات الجزر بالطريقة العادية بزراعة البذور وبزراعة الأنسجة. أنظر الأشكال بالملحق.



شكل ١٤ ز: تكوين نبات الجزر عن طريق مزارع الأنسجة (جذور). أنظر الجزء الثاني.

جدول ٩: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى والكبرى، والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة في تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة في نباتات الذرة.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Macronutrients</b>			
Potassium nitrate	2500	1212	1900
Ammonium nitrate	165	640	1650
Calcium chloride	176	588	440
Magnesium sulphate	370	247	370
Potassium phosphate	510	136	170
<b>Micronutrients</b>			
Manganese sulphate	22300	11150	22300
Zinc sulphate	2870	5760	8600
Boric acid	6200	3100	6200
Potassium iodide	830	830	830
Copper sulphate	25	25	25
Sodium molybdate	250	240	250
Cobalt chloride	25	24	25
Ferrous sulphate	13900	27800	27850
Na <sub>2</sub> EDTA	18600	37300	37250
<b>Vitamins</b>			
Inositol	--	90	--
Thiamine-HCL	400	8500	250
Nicotinic acid	--	6000	1250
Pyridoxine-HCl	--	1000	250
Ca pantothenate	--	--	250
<b>Amino acid and amids</b>			
Glycine	--	2	7.5
Asparagine	--	--	2250
Glutamic acids	147	--	--
Serine	105	--	--

تابع جدول ٩:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Growth regulators</b>			
2.4-D	15	2	--
Sucrose	20	20	20
Agar	7	--	8
pH	5.8	6	5.8

\* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمليجرامات.

\*\* أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

\*\*\* أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

\*\*\*\* أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.



جدول ١٠: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة في تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة في نباتات القمح.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Macronutrients</b>			
Potassium nitrate	950	100	1900
Ammonium nitrate	825	--	1650
Calcium chloride	220	150	440
Magnesium sulphate	185	250	370
Magnesium chloride	--	300	--
Potassium phosphate	85	--	170
Sodium phosphate	--	90	--
Ammonium sulphate	--	200	--
<b>Micronutrients</b>			
Manganese sulphate	11150	13200	22300
Zinc sulphate	4300	3000	8600
Boric acid	3100	3000	6200
Potassium iodide	415	750	830
Copper sulphate	12.5	250	25
Sodium molybdate	12.5	250	250
Cobalt chloride	12.5	250	25
Ferrous sulphate	13925	13900	27900
Na <sub>2</sub> EDTA	18625	18600	37250
<b>Vitamins</b>			
Inositol	50	100	100
Thiamine-HCL	50	10000	400
Nicotinic acid	250	1000	
Pyridoxine-HCl	250	1000	
<b>Amino acids</b>			
Protein hydrolysate	--	--	2000

تابع جدول ١٠ :

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Growth regulators</b>			
<b>Kinetin</b>	<b>1</b>	--	--
<b>2,4-D</b>	<b>0.5</b>	<b>2</b>	--
<b>IAA</b>	<b>3.2</b>	--	<b>2</b>
<b>Sucrose</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
<b>Agar</b>	<b>5</b>	--	<b>10</b>
<b>pH</b>	<b>5</b>	<b>6.2</b>	<b>5.8</b>

\* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمليجرامات.

\*\* أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

\*\*\* أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

\*\*\*\* أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١١: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة في تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة في نباتات الطماطم.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Macronutrients</b>			
Potassium nitrate	2500	1900	1900
Ammonium nitrate	--	1650	1650
Calcium chloride	200	440	440
Magnesium sulphate	400	370	370
Potassium phosphate	--	170	170
Ammonium sulphate	300	--	--
<b>Micronutrients</b>			
Manganese sulphate	13200	22300	22300
Zinc sulphate	1000	8600	8600
Boric acid	5000	6200	6200
Potassium iodide	1000	830	830
Copper sulphate	200	25	25
Sodium molybdate	--	250	250
Cobalt chloride	100	25	25
Ferrous sulphate	1500	27850	27850
Na <sub>2</sub> EDTA	20000	37250	37250
<b>Vitamins</b>			
Inositol	1000	100	100
Thiamine-HCL	5000	100	10000
Nicotinic acid	5000	500	1000
Pyridoxine-HCl	500	--	1000
<b>Amino acids</b>			
Glycine	--	2	--
<b>Growth regulators</b>			
2,4-D	0.5	--	--



تابع جدول ١١:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
CPA	2	--	--
Kinetin	0.1	--	--
IAA	--	2	--
BAP	--	2.5	0.23
NAA	--	--	0.93
Sucrose	30	30	30
Agar	6	--	8
pH	5.9	5.8	5.8

\* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمليجرامات.

\*\* أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

\*\*\* أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

\*\*\*\* أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١٢: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة في تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة في نباتات البطاطس.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Macronutrients</b>			
Potassium nitrate	1000	2500	1900
Ammonium nitrate	--	--	1650
Calcium chloride	150	150	440
Magnesium sulphate	250	250	370
Potassium chloride	300	--	--
Potassium phosphate	--	--	170
Sodium phosphate	90	150	--
Ammonium sulphate	200	134	--
<b>Micronutrients</b>			
Manganese sulphate	13200	13200	22300
Zinc sulphate	3000	2000	8600
Boric acid	3000	3000	6200
Potassium iodide	750	750	830
Copper sulphate	250	25	25
Sodium molybdate	250	250	250
Cobalt chloride	250	25	25
Ferrous sulphate	13900	--	27850
Na <sub>2</sub> EDTA	18600	28000	37250
<b>Vitamins</b>			
Inositol	100	100	100
Thiamine-HCL	10000	1000	500
Nicotinic acid	1000	1000	5000
Pyridoxine-HCl	1000	1000	500
Biotin	--	--	50
Folic acid	--	--	500

تابع جدول ١٢ :

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Amino acids</b>			
Glycine	--	--	2
Protein hydrolysate	2000	--	1000
<b>Growth regulators</b>			
2,4-D	2	--	--
NAA	--	2	0.1
IAA	--	--	0.05
BAP	--	--	0.5
Sucrose	20	20	10
Agar	5	--	10
pH	5.8	5.8	5.8

\* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمليجرامات.

\*\* أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

\*\*\* أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

\*\*\*\* أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.



جدول ١٣: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة في تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة في نباتات الموالح.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Macronutrients</b>			
Potassium nitrate	1900	1900	475
Ammonium nitrate	1650	1650	1000
Calcium chloride	440	440	110
Magnesium sulphate	370	370	92.5
Potassium phosphate	170	170	--
Sodium phosphate	--	--	300
Sodium sulphate	--	--	150
<b>Micronutrients</b>			
Manganese sulphate	22300	22300	11200
Zinc sulphate	8600	8600	4300
Boric acid	6200	6200	3100
Potassium iodide	830	830	420
Copper sulphate	25	25	130
Sodium molybdate	250	250	130
Cobalt chloride	25	25	130
Ferrous sulphate	27850	27850	13900
Na <sub>2</sub> EDTA	37250	37250	18600
<b>Vitamins</b>			
Inositol	100	100	200
Thiamine-HCL	100	10000	20
Nicotinic acid	500	5000	100
Pyridoxine-HCl	500	1000	100
Biotin	--	--	50
Folic acid	--	--	100
Riboflavin	--	--	50
Ascorbic acid	--	--	3000

تابع جدول ١٣ :

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Amino acids</b>			
Glycine	2	2	--
<b>Growth regulators</b>			
NAA	2	--	--
BAP	--	10	--
IAA	--	--	0.25
Kinetin	--	--	0.5
Sucrose	20	50	20
Agar	6	--	7
pH	5.8	5.4	5.7

\* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمليجرامات.

\*\* أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

\*\*\* أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

\*\*\*\* أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١٤: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة في تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة في أشجار المانجو.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Macronutrients</b>			
Potassium nitrate	950	950	1900
Ammonium nitrate	825	825	1650
Calcium chloride	220	220	440
Magnesium sulphate	185	185	370
Potassium phosphate	85	85	170
<b>Micronutrients</b>			
Manganese sulphate	22300	22300	22300
Zinc sulphate	8600	8600	8600
Boric acid	6200	6200	6200
Potassium iodide	830	830	830
Copper sulphate	25	25	25
Sodium molybdate	250	250	250
Cobalt chloride	25	25	25
Ferrous sulphate	13925	27850	27850
Na <sub>2</sub> EDTA	18625	37250	37250
<b>Vitamins</b>			
Inositol	100	100	100
Thiamine-HCL	100	100	100
Nicotinic acid	500	500	500
Pyridoxine-HCl	500	500	500
Ascorbic acid	10000	10000	--
<b>Amino acids</b>			
Glycine	2	2	2
Glutamine	400	400	--
<b>Growth regulators</b>			
2,4-D	2	--	--



تابع جدول ١٤ :

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
NAA	--	--	5
Kin	--	--	2.5
Sucrose	30	30	40
Agar	8	--	7
pH	5.7	5.7	5.7

\* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمليجرامات.

\*\* أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

\*\*\* أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

\*\*\*\* أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١٥: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة في تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة في نباتات البجونيا.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Macronutrients</b>			
Potassium nitrate	1900	1900	1900
Ammonium nitrate	1650	1650	1650
Calcium chloride	440	440	440
Magnesium sulphate	370	370	370
Potassium phosphate	170	170	170
<b>Micronutrients</b>			
Manganese sulphate	22300	22300	22300
Zinc sulphate	8600	8600	8600
Boric acid	6200	6200	6200
Potassium iodide	830	830	830
Copper sulphate	25	25	25
Sodium molybdate	250	250	250
Cobalt chloride	25	25	25
Ferrous sulphate	27850	27850	27850
Na <sub>2</sub> EDTA	27250	37250	37250
<b>Vitamins</b>			
Inositol	100	100	100
Thiamine-HCL	100	100	100
Nicotinic acid	500	500	500
Pyridoxine-HCl	500	500	500
<b>Amino acids</b>			
Glycine	2	2	2
<b>Growth regulators</b>			
NAA	1	--	0.01
BAP	0.01	--	0.1

تابع جدول ١٥ :

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Sucrose	30	30	30
Agar	6	--	6
pH	5.8	5.8	5.8

\* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمليجرامات.

\*\* أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

\*\*\* أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

\*\*\*\* أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.



جدول ١٦: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة في تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة في نباتات الكوردلين Cordyline تشابه في شكلها نباتات الدراسينا.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
<b>Macronutrients</b>			
Potassium nitrate	1900	1900	1900
Ammonium nitrate	1650	1650	1650
Calcium chloride	440	440	440
Magnesium sulphate	370	370	370
Potassium phosphate	170	170	170
<b>Micronutrients</b>			
Manganese sulphate	22300	22300	22300
Zinc sulphate	8600	8600	8600
Boric acid	6200	6200	6200
Potassium iodide	830	830	830
Copper sulphate	25	25	25
Sodium molybdate	250	250	250
Cobalt chloride	25	25	25
Ferrous sulphate	27850	27850	27850
Na <sub>2</sub> EDTA	37250	37250	37250
<b>Vitamins</b>			
Inositol	100	100	100
Thiamine-HCL	100	100	1000
Nicotinic acid	--	500	--
Pyridoxine-HCl	--	500	--
<b>Amino acids</b>			
Glycine	2	2	--
<b>Growth regulators</b>			
2,4-D	3	--	--

تابع جدول ١٦:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Sucrose	20	30	20
Agar	9	--	6
pH	5.6	5.8	5.8

\* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمليجرامات.

\*\* أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

\*\*\* أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

\*\*\*\* أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

## **الباب الثامن**

# **البلازميدات Plasmids**





## البلازميد Plasmids

البلازميدات عبارة عن جزيئات دنا حلقية circular زائدة الحلزنة ملتفة على بعضها supercoiled (شكل ١١٥)، موجودة في أغلب أنواع البكتيريا وليت في جيع السلالات. أغلب البلازميدات صغيرة الحجم حوالى ٠.٢ إلى ٤% من حجم الكروموسوم البكتيرى (جدول ١٧).

في أغلب حالات النمو فإن البلازميدات غير ضرورية للخلايا العائلة لها. كثير من البلازميدات، على أى حال، تحتوى جينات لها قيمة أو تأثير في بيئات خاصة أى لها تأثير في حالات وظروف خاصة معينة. عادة تكون هذه الجينات هي الدليل الرئيسى على وجود البلازميد. مثال لذلك، أن بعض البلازميدات R تجعل الخلايا البكتيرية الحاملة لها مقاومة لبعض المضادات الحيوية، ولذلك في الطبيعة فإن الخلية التى تحتوى على هذا البلازميد تعيش أفضل في البيئات الموجودة بها مضادات حيوية.

في كثير من أنواع البكتيريا تكون البلازميدات مسئولة عن نقل الجينات بين الخلايا بطريقة معينة خاصة. هذه الخاصية سببت بداية الإهتمام بالبلازميدات فى الخمسينيات. تماثل البلازميدات الفاجات في صفة معينة في أنها معتمدة أو بشدة على نواتج التحول الغذائى في خلية العائل أى البكتيريا لى تتكاثر. تستخدم البلازميدات طبيعياً أغلب آليات التكاثر أى التضاعف فى العدد replication machinery الخاصة بخلية العائل وهى بذلك موديلات نافعة للتعرف وفهم آلية حدوث التكاثر فى دنا خلية البكتيريا.

وبالإضافة إلى ذلك فهى هامة جداً لباحثى وعلماء وراثة الميكروبات microbial geneticists وذلك لتكوين وتركيب وعمل الحالات ثنائية الأساس الكروموسومى الجزئية partial diploids فى الخلايا البكتيرية، وبالإضافة إلى ذلك فهى هامة جداً فى الهندسة الوراثية لأنها تستخدم بكثرة كناقل وسيط للجينات المطلوب توطئها

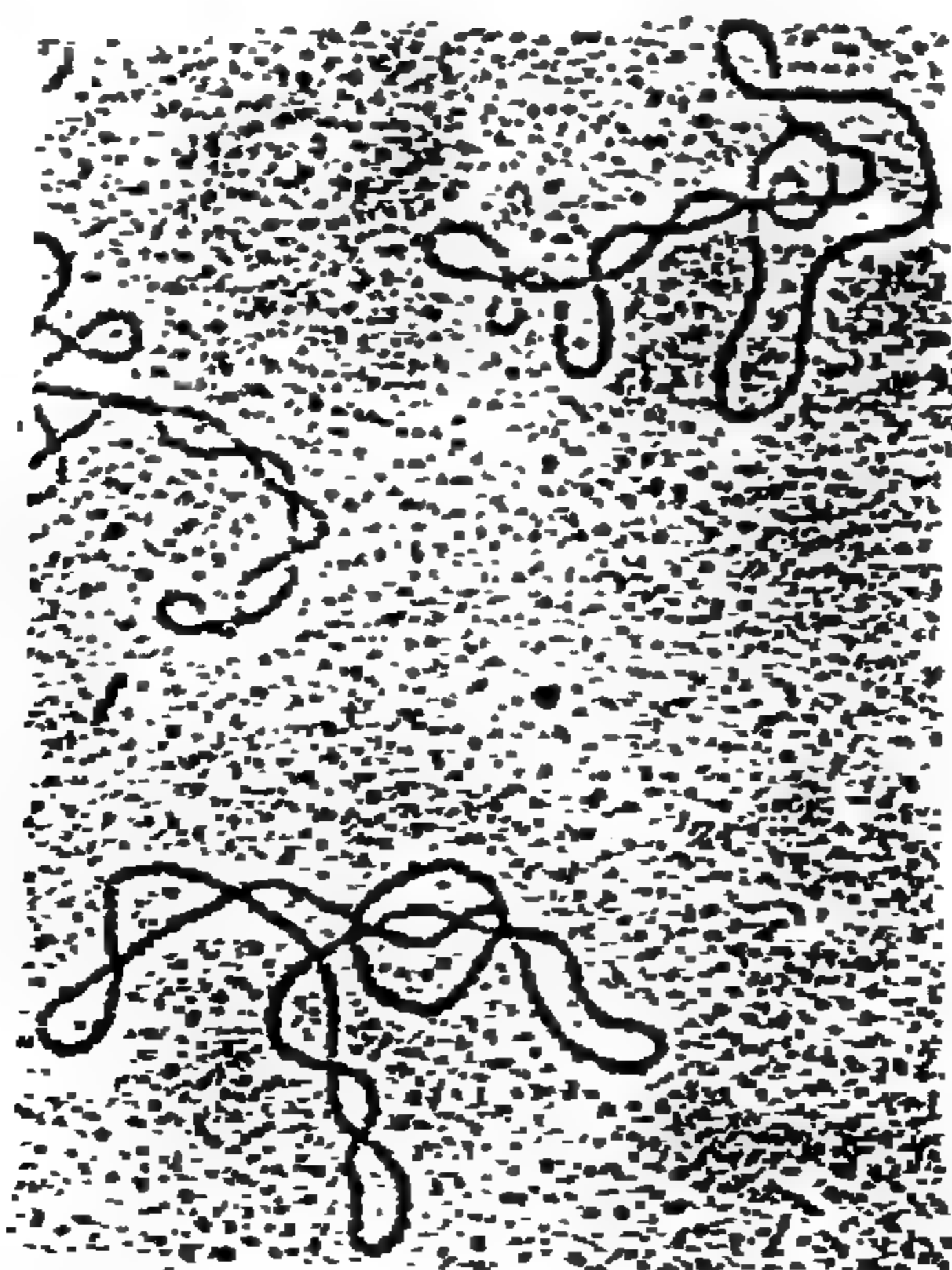
gene-cloning vehicles. وهي تستخدم لذلك بكثرة في كثير من أبحاث البيولوجيا الجزيئية molecular biology والوراثة الجزيئية molecular genetics.

جدول ١٧ : أمثلة لبعض البلازميدات وخواصها.

البلازميد	الحجم (Kb)	عدد النسخ لكل كروموسوم	الانتقال الذاتي	خواص البلازميدات وتأثيرها على الشكل الظاهري
بلازميدات				
البلازميد ColE2	٦٤	١٥-١٠	لا	يفسد تدرج الطاقة energy gradient بسبب مناعة العائل لكوليسين E1
البلازميد ColE2	٧,٦	١٥-١٠	لا	عبارة عن Dnase، يسبب مناعة العائل لكوليسين E2
البلازميد ColE3	٧,٦	١٥-١٠	لا	عبارة عن Rnase ريبوسومي، يسبب مناعة العائل لكوليسين E3
بلازميد F	٩٤,٥	٢-١	نعم	تكوين الهديب F أو الهديبات F أى F pilus - لها دور في حدوث التزاوج
بلازميدات R				
R100	١٠٦,٧	٢-١	نعم	تجعل العائل مقاوم للمضادات الحيوية تتراميسين Tetr والمقربتوميسين Strr، Camr، Sulr
RK2	٥٦	٨-٥	نعم	مدى عوائلي واسع
pSC101	٩	أقل من ٥	لا	عدد النسخ منخفض، توافق مع طرز البلازميدات ColE1 و Tetr
بلازميد الفاج $\lambda$ dy	٦,٤	٥٠	لا	جينات لامدا $\lambda$ genes cro, cl, O, P
بلازميدات معاد صياغتها (هجين) recombinant				
pBR322	٤,٤	٢٠	لا	عدد من النسخ متوسط، تضاعف وتكرار طراز ColE1، Ampr
pUC 18	٢,٧	٥٠٠-٢٠٠	لا	عدد كبير من النسخ تضاعف وتكرار طراز ColE1 مع وجود طفرة تزيد من عدد النسخ Ampr
pACYC 184	٤	١٢-١٠	لا	تجعل العائل مقاوم للمضادين تتراميسين Tetr و Camr



Plasmid	Size (kb)	Number of copies per chromosome	Self-transmissible	Phenotypic features
<i>Col plasmids</i>				
ColE1	6.4	10-15	No	Colicin E1 disrupts energy gradient, host immunity to Colicin E1
ColE2	7.6	10-15	No	Colicin E2 is a Dnase, host immunity to Colicin E2
ColE3	7.6	10-15	No	Colicin E3 is a ribosomal, host immunity to Colicin E3
<i>F plasmid</i>	94.5	1-2	Yes	F-plus, conjugation
<i>R plasmids</i>				
R 100	106.7	1-2	Yes	Cam <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Sul <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
RK2	56.0	5-8	Yes	Broad host range
pSC 101	9.0	< 5	No	Low copy number, compatible with ColE1-type plasmids, Tet <sup>r</sup>
<i>phage plasmid</i>				
λ dv	6.4	50	No	Genes cro, cl, o, p
<i>Recombinant plasmids</i>				
pBR322	4.4	20	No	Medium copy number, ColE1-type replication, Amp <sup>r</sup>
pUC18	2.7	200-500	No	High copy number, ColE1-type replication with a mutation that increase the copy number, Amp <sup>r</sup>
pACYC184	4.0	10-12	No	Cam <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>



شكل ١١٥: جزيئين من دنا زائدين الحلزونة ملتفين supercoiled (بلازميدين)

## أنواع البلازميدات

## Types of Plasmids

يختص هذا الجزء بأنواع البلازميدات وخاصة بلازميدات البكتيريا *E. coli* أمكن إثبات وجود عديد من طرز أو أنواع البلازميدات في عديد من سلالات البكتيريا *E. coli* (جدول ١٧)، ولكن الكم الأكبر من المعلومات تم التعرف عليه من ثلاث طرز أو أنواع رئيسية تقريباً وهي البلازميدات Col, R, F والتي تشترك في بعض الخواص ولكن غالباً ما تكون مختلفة تماماً في أغلب الخواص. وجود هذه البلازميدات في الخلية يتم التعرف عليه أساساً بما يأتي من الخواص:

## ١- بلازميدات F أي بلازميدات الخصوبة أي بلازميدات الجنس

## F, the fertility or sex plasmids

هذه البلازميدات وسيطة حيث أنها تتوسط القابلية في نقل جينات الكروموسوم أي أنها تساعد في نقل جينات الكروموسوم من خلية بكتيرية تحتوي بلازميد F إلى خلية خالية منه. يمكن أن ينتقل بلازميد F نفسه إلى خلية بكتيرية خالية منه.

## ٢- بلازميدات R وهي بلازميدات مقاومة للعقاقير

## Rplasmids, the drug resistance plasmids

هذه البلازميدات تجعل خلايا العائل أي البكتيريا مقاومة لواحد أو أكثر من المضادات الحيوية. كثير من البلازميدات R يمكنها أن تنقل المقاومة إلى الخلايا الخالية من R.

## ٣- بلازميدات Col وهي بلازميدات منتجة الكوليسينز

## Col plasmids, the colicinogenic plasmids

تخلق البلازميدات Col البروتينات، وتعرف هذه البروتينات في مجموعها باسم colicins، وهي يمكنها أن تقتل السلالات البكتيرية المقاربة لبعضها في النسب

closely related أى نفس الطراز of the same type والتي ينقصها البلازميد Col. آلية القتل تختلف باختلاف طرز أو أنواع البلازميدات Col.

## التعرف على وجود البلازميدات

### Detection of plasmids

يمكن التعرف على وجود البلازميدات بواسطة كل من التجارب الوراثية والفيزيائية genetic and physical experiments. أول بلازميد إكتشف هو البلازميد F سلالة A من البكتيريا E. coli لها الشكل الظاهري  $\text{Met}^- \text{Bio}^- \text{Thr}^+$   $\text{Leu}^+$  تم خلطها مع سلالة ثانية B لها شكل ظاهري عكس السابقة  $\text{Met}^+ \text{Bio}^+$   $\text{Thr}^- \text{Leu}^-$  ثم تم خلط السلالتين وزراعة الخليط على بيئة الحد الأدنى. تم تكوين مستعمرات على بيئة الحد الأدنى لها الشكل الظاهري  $\text{Met}^+ \text{Bio}^+ \text{Thr}^+ \text{Leu}^+$  وتعتبر هذه المستعمرات هجين بين السلالتين. تسمى حالة الهجين هنا في البكتيريا بإسم recombinants ويكون تكرارها بدرجة  $10^{-7}$ . عند معاملة السلالة A بالإستربتومييسين ثم غسلها بالماء لتخليصها من المضاد الحيوى قبل خلط السلالتين فإن المستعمرات الهجين يستمر تكوينها. لو أن السلالة B عوملت أولاً بالإستربتومييسين لا يتكون أفراد هجين أى أفراد معاد صياغتها أى recombinant.

هذه التجربة توضح أن الهجن recombinant أى المعاد صياغتها تشتق من السلالة B وأن خلط السلالتين مع بعضهما ينشأ عنه نقل المعلومة الوراثية بطريقة واحدة one-way transfer of genetic information وفى تجربة أخرى تستخدم فيها سلالة ثالثة وهى السلالة C والتي لا يمكنها نقل أى معلومة وراثية للسلالة B. لو أن السلالة C خلطت مع السلالة A وسمح لهما بالنمو مختلطين لمدة طويلة ثم تم عزل المستعمرات C. هذه المستعمرات C الجديدة ويرمز لها  $C^-$  يمكنها نقل الجينات للسلالة B. ترجمة هذه النتائج هى أن السلالة A تحتوى على عنصر خصوبة أى عامل خصوبة a fertility element والذي يسمى F



والذى يتوسط نقل الجينات الكروموسومية من البكتيريا A إلى البكتيريا B. ينقص السلالة C العامل F.

عند نمو السلالات A, C مع بعضهما فإن F تم نقله من السلالة A إلى السلالة C مكوناً السلالة C<sup>-</sup> وهذه يمكنها نقل المعلومات الوراثية أى جزء من دنا ويمكن أن يطلق على هذا الجزء من دنا المعلومات الوراثية أو الدلالات الوراثية إلى السلالة B.

وهكذا كان التهجين فى أول خطوة يمثل بالآتى:



وحيث أن عملية نقل F تكون فى طريق واحدة one-way nature of transfer فإن الخلية المحتوية على F تعتبر واهبة donor وتعتبر ذكر male والخلية الخالية من F تعتبر مستقبلة recipient وتعتبر أنثى female.

تسمى الأنواع المختلفة من F بإسم F variants ويرمز لها بـ F شرطة F<sup>-</sup> تم دراستها بتفصيل كبير وهى تحمل أوبيرون Lac (operon lac) وقد إستعمل فى تكوين أى تركيب خلايا ثنائية جزئياً partial diploids. يسمى هذا بإسم F<sup>-</sup> lac. أما عن كيفية نقل F<sup>-</sup> lac وذلك بإستخدام بيئة الحد الأدنى مضاف إليها لاكتوز ومضاد حيوى مثل ستربتوميسين وصبها فى أطباق بترى ويتم تنمية خليط من سلالتين بكتيريتين على هذه البيئة أحدهما سلالة واهبة حساسة للإستربتوميسين وسلالة أخرى مستقبلة مقاومة للإستربتوميسين.

ولذلك فى هذه الحالة يكون التهجين كما يلى:



وفى التهجين السابق تكون الخلايا الواهبة حاملة المعلم أو الدلالة lac<sup>+</sup> (lac<sup>+</sup> marker) على البلازميد والمعلم أو الدلالة lac<sup>-</sup> على الكروموسوم (لاحظ إستعمال

الشرطة المائلة في المثال (/) للتمييز بين لمعلمات البلازميدية والمعلمات أى الدالات الكروموسومية).

زراعة مخلوط السلالتين على بيئة آجار الحد الأدنى لاكتوز minimal-lactose agar المضاف إليها ستربتوميسين ينتج عنهما سلالة هجين recombinant أى سلالة معاد صياغتها ويكون تركيبها  $F' lac^+/lac^- Str^r$ . تكون المقارنة control هنا عبارة عن أطباق بها السلالة الواهبة فقط وتكون النتيجة عدم نمو هذه السلالة فى الأطباق، حيث جميع الخلايا حساسة للإستربتوميسين. تكون المقارنة الثانية بأطباق بها السلالة المستقبلية فقط وتكون النتيجة عدم نمو هذه السلالة فى الأطباق حيث أن جميع الخلايا تركيبها  $lac^-$  لاحظ أن وظيفة معلم أو دلالة الإستربتوميسين streptomycin marker هى منع نمو الخلايا الواهبة وهذا المعلم يسمى بالإنتخاب المضاد counterselection marker أو بمعلم أو دلالة الإنتخاب المضاد conterselctive marker. تستخدم عادة مقاومة المضاد الحيوى لغرض الإنتخاب المضاد، ولكن يمكن إستخدام أشكال ظاهرية أخرى other phenotypes فى هذا الغرض. ومثال لذلك نقل  $F^-$ .

يمكن التعرف عليه بالتأجين بين سلالتين كما يأتى:



وزراعة هاتين السلالتين المختلطتين على أطباق بترى فيها بيئة الحد الأدنى لاكتوز. السلالة الواهبة لن تكون مستعمرات لأن البيئة خالية من الميثيونين (غياب الميثيونين فى الإنتخاب المضاد) والسلالة المستقبلية التى ينقصها  $F' lac^+$  لن تنمو ولن تكون مستعمرات لأنها تحتوى  $lac^-$  وهى بذلك تكون غير قادرة على إستخدام اللاكتوز كمصدر للكربون، وفى هذه الحالة يكون المعلم المختار selected marker هو  $lac^+$ . ولكن الخلايا الهجين أى recombinant أى المعاد صياغتها هى الوحيدة التى ستنمو وسيكون تركيبها  $F' lac^+/lac^- met^+$  ولأنها

تحتوى العوامل الوراثية الخاصة بتخليق الميثيونين ذاتياً والخاصة بالقدرة على استخدام سكر اللاكتوز كمصدر للكربون.

مرة أخرى نعود للتجربة الأولى أى التهجين بين السلالة A والسلالة B والتي يستخدم فيها  $F^-$ . وجد أن السلالات  $F^-$  الناتجة تظهر إختلافات كمية جوهريّة مؤكدة. عند خلط السلالتين قبل الزراعة بنصف ساعة فإن الهجن أى الخلايا المعاد صياغتها recombinant تنشأ بتعداد  $10^{-6}$  لكل خلية واهبة فى تجربة الهجين بين BXA وحوالى 50% فى تجربة  $F^- lac$ . الإختلاف هنا فى أن فى التجربة  $F^- lac$  هى أن البلازميد يحمل المعلم الوراثى أو الدلالة الوراثية genetic marker بينما هذه المعلومات أو الدلالات الوراثية فى التجربة BXA تكون كروموسومية. وهكذا فى التجربة BXA بالرغم من أن حوالى نصف الخلايا المستقبلية تستقبل نسخة من  $F^-$  فإن جزء بسيط جداً منها يستقبل المعلومات أو الدلالات الكروموسومية. هذه الحالة من الإنتقال للكروموسوم rare chromosomal mobilization نادرة الحدوث ولكنها ثابتة فى البكتيريا.

#### كيفية إنتقال البلازميد Plasmid transfer:

تم عمل التهجين بين سلالتين من البكتيريا كما يأتى:



معنى  $tsx^r$  أن خلية البكتيريا ليس لها القدرة على إمتصاص الفاج T6. بعد فترة من خلط السلالتين مع بعضهما فإن جزء من هذا المخلوط تم زراعته فى أطباق بترى محتوية بيئة الحد الأدنى لاكتوز وبها دليل ملون وبها ستربتوميسين، وجد أن 90% من المستعمرات كانت  $lac^+$ .

وهكذا إن أغلب الخلايا الواهبة نقلت  $F^- lac^+$ . لتحديد هل الخلايا الواهبة التى وهبت  $F^- lac^+$  للخلايا المستقبلية لارالت محتفظة بنسخة من البلازميد أو فقدت



البلازميد تماماً نتيجة لإنتقاله للخلايا الواهبة. فإنه يتم أخذ جزء من مخلوط التزاوج mating mixture ثم يتم معاملتها بكمية زائدة من فاج T6. فقد وجد درجة عالية جداً من إصابة خلايا البكتيريا بالفاج وهي خلايا السلالة المستقبلية الحساسة للفاج قد تحللت في ظروف دقائق نتيجة لتأثير بسيط وهو أن آلاف جزيئات الفاج قد أحدثت ثقب في جدار الخلية البكتيرية. الخلايا الحية المتبقية والتي تكون مقاومة للفاج تم نقلها لبيئة الحد الأدنى لاكتوز ودليل وبدون ستربتوميسين فقد تكونت مستعمرات بكثرة. معنى ذلك أن الخلايا الواهبة لازالت تحتفظ بنسخة من البلازميد.

ومن تجارب أخرى كثيرة أمكن إستنتاج أن غالبية خلايا السلالة الواهبة تحتوى على نسخة واحدة فقط من  $F' lac^+$ . وهكذا فإن الخلايا التي قامت بنقل البلازميد لازالت محتفظة بنسخة من البلازميد، وذلك يعنى أن قبل النقل مباشرة أو أثناء النقل يحدث تضاعف لدنا البلازميد بحيث نسخة تنتقل للخلية المستقبلية ونسخة تبقى في الخلية الواهبة وهكذا يتكرر ذلك. وقد أمكن إثبات ذلك بتجارب إضافية أخرى حيث أن الخلايا المعاد صياغتها تبقى قادرة باستمرار على نقل المعلم  $lac^+$ .

**كيفية الإستدلال على وجود البلازميد إذا لم يكن له تأثير ظاهري بسيط**

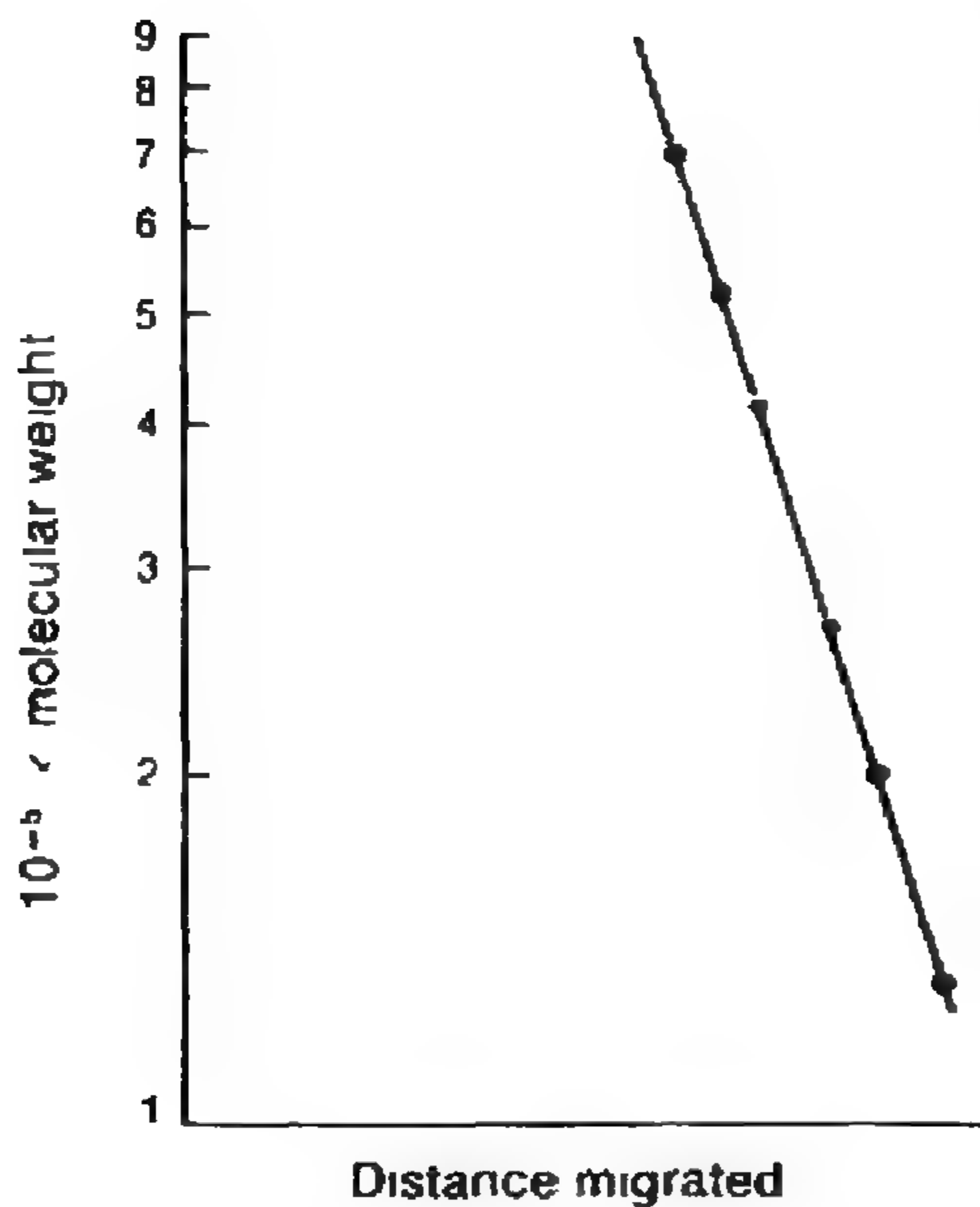
**How you can detect a plasmid if it does not have simple genetic phenotypes?**

يتم أخذ مستعمرة واحدة من الطبق ثم يتم تحليل الخلايا البكتيرية بركة gently ويتم فصل وتنقية دنا بواسطة طريقة agarose gel electrophoresis.

حيث أن الكروموسوم البكتيرى لا يمكنه تخلل الأجاروز والعكس صحيح في البلازميد فإنه صغير ويهاجر في الأجاروز. عند وجود البلازميد فإنه يكون شريط ضيق (حزمة ضيقة) في الجل gel في موقع مميز لوزنه الجزيئى.

يمكن الكشف عن الحزمة band بصيغها أولاً لكي يمكن رؤيتها وذلك بصيغ الجل ببروميد الإيثيديم. حيث أن بروميد الإيثيديم يلتصق بشدة بجزء دنا وعند تعريض ذلك للأشعة فوق البنفسجية فإنه تحدث فلورة لدنا البلازميد نتيجة فلورة بروميد الإيثيديم ويمكن رؤيته بالعين المجردة (شكل ١١٦).

وبحساب المسافة أي مسافة هجرة جزء دنا في زمن معين يمكن التعرف على الوزن الجزيئي لدنا البلازميد وذلك بمقارنته بمسافة هجرة جزء دنا بلازميد معروف وزنه الجزيئي (شكل ١١٦) وفي نفس الزمن.



شكل ١١٦: (١) هجرة دنا خمسة أنواع من البلازميدات من القاعدة إلى القمة في جل الأجاروز. كل دنا بلازميد ملتصق بشدة مع جزيئات بروميد الإيثيديم التي تتفلور ويمكن رؤيتها. كل جزء دنا في حارة lane، (٢) حساب الوزن الجزيئي لدنا البلازميد من منحنى قياس.

## تنقية دنا البلازميد

### Purification of Plasmid DNA

يمكن تنقية دنا البلازميد من البكتيريا بطريقة معينة يمكن تلخيصها كما يلي. يمكن كسر الخلايا البكتيرية بركة gently opened بواسطة معاملتها بمنظف detergent. المحلول الناتج يسمى cell lysate ويكون شبه شفاف يتم تعريضه للترد المركزي. يرسب الكروموسوم البكتيري الكبير المندمج في قاع أنبوبة الترود المركزي وهو يتكون من دنا ورنأ بروتين في حين أن دنا البلازميد صغير الحجم يبقى معلق في supernatant ويسمى بالرائق cleared lysate.

بعض أجزاء من دنا الكروموسوم يمكن أن يوجد في cleared lysate ولكن حيث أن بلازميد دنا حلقي covalently circular فإنه يمكن فصل أجزاء دنا الكروموسوم الملونة بهذا cleared lysate بواسطة طرق عديدة. يمكن أيضاً فصل البلازميدات المقطوعة التي أصبحت غير حلقية not covalently circular بطرق عديدة.

## إنتقال البلازميد دنا

### Transfer of Plasmid DNA

بداية التعرف على وجود البلازميدات  $F^-$ ،  $F^+$  عن طريق قدرتها على الإنتقال من خلية واهبة إلى خلية مستقبلة. كيف يتم إنتقال دنا.

#### خطوات في عملية الإنتقال Stages in transfer process:

وضحت أحد الإكتشافات المبكرة عن الارتباط recombination بين خلايا واهبة وخلايا مستقبلة أنها تحتاج إلى تلامس مع خلية أخرى. هذه أمكن إثباتها بواسطة تجارب عن مزارع  $F^-$  ومزارع  $F^+$  المفصولة بغشاء أو مرشح مسامي porous filter. لا تتكون الخلايا الهجين أي المعاد صياغتها أي recombinant



عند منع تلامس خلية مع أخرى أى لابد من حدوث عملية التلامس ولذلك فقد إستنتج أن حدوث تكوين الخلايا المعاد صياغتها أى الهجين أى recombinant لا يحدث بسهولة، أى نتيجة حركة المادة الوراثية خلال بيئة النمو، بل أكثر تعقيداً من ذلك. وقد دعى ذلك إلى إستخدام لفظ التزاوج البكتيرى bacterial conjugation or mating.

بعد ذلك بعد سنوات، تم الحصول على صورة رائعة بالمجهر الإلكتروني عند تزاوج البكتيريا. أوضحت عديد من التجارب أن نقل البلازميد يمكن أن يضيف إلى أربعة مراحل وهى:

١ - تكوين أزواج من الخلايا متخصصة أى كل زوج يشمل خلية واهبة وخلية مستقبلية يكون كل خلية واهبة ملامسة تماماً لخلية مستقبلية يسمى ذلك بالتلامس الفعال effective contact.

٢ - إعداد لإنتقال دنا DNA mobilization.

٣ - إنتقال دنا DNA transfer.

٤ - تكوين بلازميد نشط فعال قابل للتضاعف أى التكرار فى الخلية المستقبلية.

عند تلامس خلايا محتوية على  $F$  أو  $F'$  مع خلية مستقبلية فإن الأربعة خطوات يتم حدوثها بالتتابع السابق. كثير من أنواع البلازميدات على أى حال غير قادرة وراثياً على القيام بجميع هذه الخطوات. يمكن تبعاً لذلك تصنيف البلازميدات إلى أربعة مجاميع ويتوقف ذلك على هذه الخواص وهى:

١ - بلازميدات غير قابلة للإنتقال non-transmissible plasmids وهى بلازميدات ينقصها الجينات الخاصة بالتلامس الفعال وإنتقال دنا.

٢ - بلازميدات التزاوج conjugative plasmids وهى بلازميدات تحمل جينات خاصة بحدوث التلامس الفعال.

٣ - بلازميدات متحركة mobilized plasmids وهي بلازميدات قادرة على تخليق دنا اللازم لعملية الانتقال.

٤ - بلازميدات ذاتية الانتقال self-transmissible plasmids وهي مثل بلازميد F وحيث تكون قادرة على الانتقال وأيضاً قادرة على التزاوج.

حدوث الانتقال لحدوث التزاوج في كثير من الحالات لا يكون خاص ببلازميد معين، ولذلك فإن بلازميد واحد يمكنه أن يساعد في نقل بلازميد ثان. مثال ذلك أن خلية منفردة تحتوى كل من البلازميد F والبلازميد ColE1. يتميز البلازميد F بأنه متحرك ومتزاوج أن له هاتين الصفتين ولذلك فهو ذاتى الانتقال. بلازميد ColE1 منتقل ولكنه غير متزاوج. ولذلك فإن خلية تحتوى على ColE1 فقط لا يمكنه نقل البلازميد. في خلية تحتوى على كلا البلازميدين فإن F يمكن أن يعوض التزاوج الفعال المفقود والخاص بالبلازميد ColE1، ولذلك فإن ColE1 تبعاً لذلك يمكن أن ينتقل إلى خلية مستقبلة ينقصها البلازميد.

هذه الطريقة والتي فيها البلازميد الغير متزاوج يتم نقله عن طريق التلامس الفعال والذي يتم حدوثه بواسطة بلازميد متزاوج تسمى بالهبة أو العطاء donation، والعلامة المميزة لذلك هو النقل الفعال للبلازميد الغير متزاوج بنسبة ١٠ إلى ١٠٠% الأكثر من ذلك أن عملية الانتقال خاصة بالبلازميد ذاتى الانتقال ولذلك فإن هذا البلازميد المنتقل ذاتياً لا يمكن البلازميد الغير منتقل من الانتقال بواسطة تكامل بينهما بطريقة سهلة أو بسيطة simple complementation، ولكن بالرغم من ذلك يمكن أن يحدث الانتقال في بعض الحالات ولكن بدرجة منخفضة جداً.

أى أن الانتقال في هذه الحالة للبلازميد الغير منتقل بواسطة تكامل غاية في التعقيد. أولاً لكي يحدث ذلك لابد أن يحدث توافق وإرتباط بين البلازميدين recombination ليتكون جزيء دنا واحد يكون قابل للانتقال single transferable

DNA molecule. ولذلك فإن البلازميد المنتقل ذاتياً يحمل معه البلازميد الغير منتقل وتسمى هذه العملية بالحمل أو بالتوصيل conduction وهي عكس الهبة أو العطاء donation، ومن هنا تكرارية حدوث نقل البلازميد الغير متزاوج هي التي تحدد هل العملية هبة أو توصيل في حالة الهبة تكون نسبة البلازميدات المنتقلة كبيرة جداً نسبياً بالمقارنة بنسبة البلازميدات المنتقلة في حالة التوصيل.

في حالة توسط F في نقل الكروموسوم فإن الكروموسوم ينتقل بالحمل أى التوصيل، ولذلك يحدث توافق وإرتباط genetic recombination بين تتابعات نيوكليوتيدات في F وفي الكروموسوم وهكذا يحمل F الكروموسوم إلى الخلية المستقبلية. الإنتقال للكروموسوم بواسطة الحمل والذي يحدث بتكرارية منخفضة جداً، أى يحدث بتكرارية أقل بدرجة  $10^6$  مرات نقص عنه في حالة تكرارية حدوث نقل المعلم أو الدليل أو الدالة  $lac^+$  من الخلية الحاوية له ذات التركيب  $F'$  إلى الخلية المستقبلية. أى معنى ذلك أن درجة وتكرارية نقل الجين الكروموسومى أقل بكثير جداً من درجة تكرارية نقل الجين البلازميدى.

### التلامس الفعال والهديبات

#### Effective Contact and Pili

الخطوة الأولى في التلامس الفعال أى التلامس لنقل الصفات الوراثية هو الإزدواج pair formation أى توافق الخلايا فى أزواج كل زوج يشمل خلية واهبة وخلية مستقبلية، تحتاج هذه الحالة إلى زائدة تشبه بروتينية تسمى هديب جنسى sex pilus توجد على الخلية الواهبة (شكل ١١٧). الخلية المحتوية على F تسمى الهديبات الجنسية بإسم الهديبات F أى Fpili والخلايا المحتوية على R تسمى الهديبات R أى R pili. فى المتوسط يوجد ١,٤-٢,٧ هديبات F لكل خلية ويتوقف ذلك على الظروف البيئية للنمو البكتيريا.



يتم تنقية الهديب F يتكون الهديب من تركيب أنبوبي مجوف يتكون من بروتين واحد فقط كاره للماء يسمى بيلين pilin. من نتائج التجارب إتضح أن الهديب F ضروري للتزاوج. ومن هذه التجارب ما يأتي:

١ - وجد طفرات في البلازميد غير قادرة على تخليق الطراز البري من البيلين وبالتالي فإنها غير قادرة على نقل البلازميد.

٢ - يمكن إزالة الهديبات من الخلايا بواسطة الرج القوى للمزارع. يمكن أن تتكون هديبات على الخلايا مرة أخرى في خلال نصف ساعة. لا يمكن للبلازميدات أن تنتقل من الخلايا في الفترة التي تكون فيها الخلايا البكتيرية خالية من الهديبات.

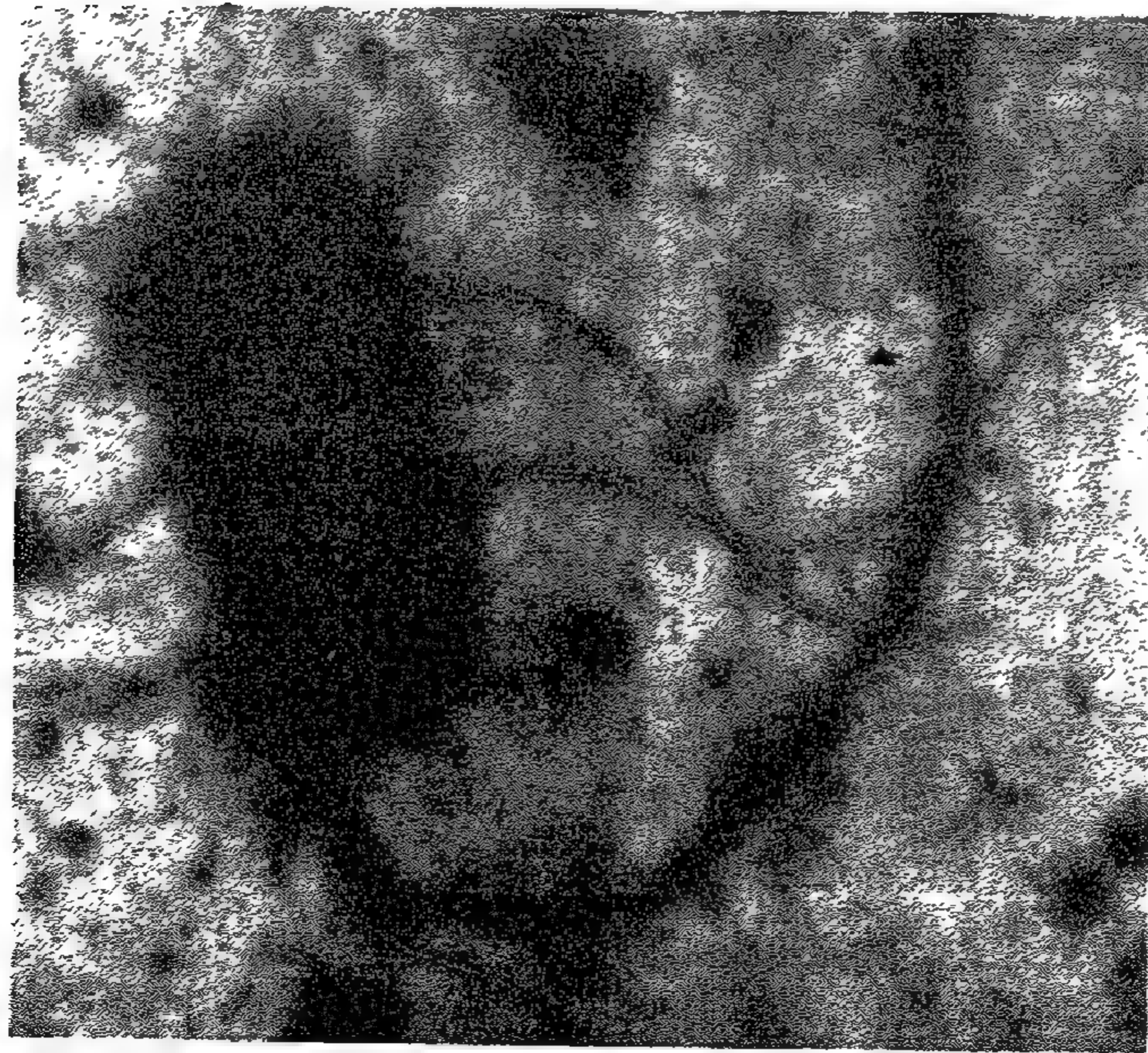
٣ - الهديبات النقية يمكن أن تلتصق بالخلية المستقبلة.

٤ - عديد من الفاجات يمكن أن تلتصق بالهديبات F وتسمى أحياناً تبعاً لذلك هذه الفاجات بإسم الفاجات الذكرية التخصص male-specific phage. هذه الفاجات نوعين أحدهما يلتصق بقمة الهديب والنوع الآخر يلتصق بالساق. النوع الملتصق بقمة الهديب يمنع ويثبط عملية الإزدواج للخلايا وانتقال البلازميدات وفي النوع الثاني أى الفاجات الخاصة بالساق فإنها لا تتدخل بطريقة رئيسية في نقل F. أى ليس لها دور رئيسى في عملية نقل F.

وحيث أن الهديب أنبوبة مجوفة فإنه يعتقد أن دنا البلازميد ينتقل خلال تجويف الهديب. عامة لا توجد تجربة أثبتت وجود دنا داخل الهديب في التجويف. في تجارب أخرى أمكن إثبات الهديبات يمكن أن تتكمش في اتجاه الخلية الواهبة بعد الإزدواج. وهكذا يبدو أن الهديب يجعل الخلية الواهبة والخلية المستقبلة على اتصال حيث يصل بينهما ثم يقوم بجانب الخليتين لبعضهما ليصبحا ملتصقتين بشدة. طبيعة وشكل وتركيب أنبوبة التزاوج الحقيقية بين الخليتين غير واضحة.

ليست جميع الأنظمة المتقابلة المتزاوجة mating systems فى سلالات البكتيريا تعتمد على الهديبات. مثال ذلك بعض سلالات البكتيريا *Streptococcus faecalis* تحمل بلازميد قابل للإنتقال ذاتياً أى بلازميد تزاوج. الخلايا المستقبلية الخالية من البلازميد تنتج بروتين خاص بالتزاوج mating protein (يشابه أو يماثل الفيرومونات phermones فى الحشرات المؤنثة) ولا تنتج الخلايا الواهة أى المحتوية على البلازميد هذا البروتين.

يسبب الفيرمون أى البروتين الخاص بالتزاوج تخليق بروتين فى الخلايا الواهة يسمى أدهسين adhesin والذي يغلف الخلايا الواهة ويسبب حدوث إلتصاق وإزدواج بين الخلايا الواهة والخلايا المستقبلية. بعد إنتقال البلازميد من الخلية الواهة إلى الخلية المستقبلية فإن تخليق الفيرمون فى هذه الخلية يتوقف.



شكل ١١٧: صورة بالمجهر الإلكتروني لخلية بكتيريا *E. coli* لها هديب واحد غامق اللون سميك نسبياً وخمسة أسواط رفيعة براقية.



## الحركة والانتقال للبلازميد

## Mobilization and Transfer of Plasmids

يبدأ الانتقال للبلازميد والذي يشفر تخليق بروتين معين *plasmid-encoded protein*. يعتقد أن هذا البروتين المعين والذي يسمى بروتين قطع *nicking* *protein* يقوم بعمل قطع مفرد لحزون واحد فقط من حلزوني البلازميد *single-strand break* عند تتابع قواعد معين مميز يسمى هذا التتابع باسم منشأ الانتقال أو النقل *transfer origin* أو *ori T*. هذا القطع يسبب حوث بداية تضاعف أى تكرار الحلقة المكرورة أى التى تكرر (مأخوذة من مكر) *rolling circular replication* أى بداية تكرار وكر الحلقة. والفرع الشريطى الحر الناتج من كر الحلقة يتم إنتقاله. يعتقد أن بروتين القطع يبقى ملتصق بالنهاية 5'، هذا النوع من الكر والتضاعف يشابه آلية كر وتضاعف الحلقة *rolling-circle mechanism* التى تحدث فى الفاج  $\phi X174$ . آلية تتابع خطوات إنتقال البلازميد تحدث فى خطوات عديدة (شكل ١١٨). يمكن أن تسمى آلية الإنتقال هذه باسم *looped rolling-circle mechanism* ينتقل الفرع الشريطى الحر الناتج من الكر وملتصق به فى قمته بروتين القطع إلى الخلية المستقبلة ثم يحدث إنتقال تام لهذا الفرع إلى الخلية المستقبلة ويتكون منه حلقة مفردة من دنا فى الخلية المستقبلة. ثم يتم تكوين حلقة أخرى من دنا مكملة للحلقة الأولى وهكذا يصبح البلازميد عادى ثنائى الحزون.

وفى هذه الأثناء تتكون حلقة أخرى مكملة للحلقة الأولى فى الخلية الواهة وهكذا يصبح البلازميد فى الخلية الواهة ثنائى الحزون. ثم يحدث للبلازميد فى كلا الخليتين حلزنة زائدة *supercoiling* لاحظ من الشكل السابق حدوث تخليق دنا أى الحزون المكمل فى كل من الخلايا الواهة والخلايا المستقبلة، وفى حالة التخليق فى الخلية الواهة يسمى *donor conjugal DNA synthesis* وفى حالة التخليق فى الخلية المستقبلة يسمى *recipient conjugal DNA synthesis*. يلاحظ



فى الخلايا الواهبة أثناء إنتقال دنا أى الفرع يحدث فى نفس الوقت تخليق حلقة دنا جديدة مكملّة.

ولكن عملية تخليق دنا لتكوين حلقة مكملّة لحدوث التضاعف فى بلازميد الخلية الواهبة ليست له أى علاقة بالقوى المحركة motive force اللازمة لنقل فرع البلازميد بالرغم من أن العمليتين تحدثان فى آن واحد، وفيما يلى ما يثبت ذلك:

١ - حدوث عملية إنتقال فرع البلازميد من الخلية الواهبة إلى الخلية المستقبلية حتى فى حالة حدوث طفرة فى الخلايا الواهبة تسبب منع تخليق دنا الحلقة أى الحزون الثانى المكمل. مثال لهذه الطفرات هى طفرة حساسة للحرارة temperature-sensitive mutation فى الجين الخاص بتخليق إنزيم بلمرة III (NA polymerase III gene).

٢ - يحدث إستمرارية فى تخليق دنا الحزون المكمل فى الخلية الواهبة بالرغم من توقف إنتقال فرع البلازميد بواسطة طفرة مناسبة فى البلازميد.

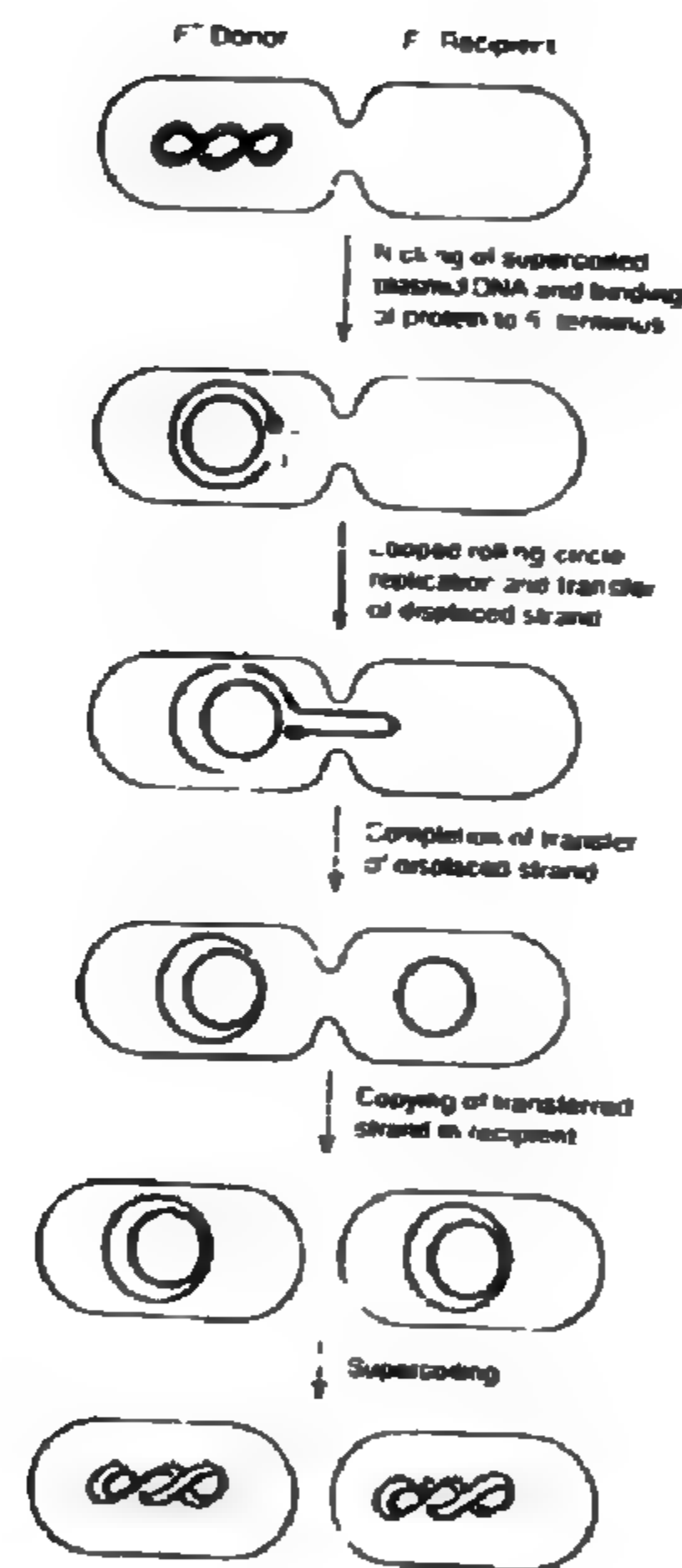
٣ - إنتقال فرع حزون دنا من الخلية الواهبة إلى الخلية المستقبلية يستمر بالرغم من حدوث طفرة فى الخلية المستقبلية تسبب منع تخليق حزون دنا المكمل فى الخلية المستقبلية.

هذه الحالات المختلفة تسبب نشوء سؤال ما هى نوعية القوى المحركة التى تسبب حركة وإنتقال فرع دنا من الخلية الواهبة إلى الخلية المستقبلية.

### تثبيط الخصوبة فى خلايا البكتيريا

#### Fertility Inhibition In Bacterial Cell

لو أن خلية واحدة من البكتيريا إ. كولاى تحتوى بلازميد F تم إضافتها إلى مزرعة من الخلايا النامية F<sup>-</sup> فإنه بعد ١٥-٢٠ جيل من نمو الخلية فإن جزء كبير من الخلايا يصبح محتوى F.



شكل ١١٨: شكل يوضح آلية انتقال بلازميد F من الخلايا الواهبة إلى الخلايا المستقبلة  
 .looped rolling-circle mechanism

هذه الحالة نتيجة لنقل مكررات replica من  $F^-$  من خلية  $F^+$  إلى خلية  $F^-$  بدون فقد  $F^-$  من خلية  $F^+$ . بعد الانتقال يبقى مكرر  $F^-$  أى  $F^-$  ذاته فى الخلية الواهبة ويمكن أن يكرر نفسه مرة أخرى وهذا المكرر ينقل إلى الخلية  $F^-$  ثانية. كل خلية مستقبلية تكتسب  $F^-$  وتصبح واهبة وتنقل بدورها  $F^-$  إلى خلية مستقبلية أخرى أى  $F^-$ . وهكذا يمكن أن يحدث ذلك باستمرار. فى الجيل الواحد للخلية يمكن أن تحدث عملية الانتقال مرة أو مرتين، وهكذا ينتشر  $F^-$  بسرعة خلال مستعمرة أو عشيرة البكتيريا bacterial population.

وهذا الانتشار السريع ليست هو الحال فى أغلب البلازميدات القابلة للانتقال. مثال ذلك أن حوالى ٠,٢% من عشيرة الخلايا البكتيرية فقط هى التى تكون قادرة على نقل غالبية بلازميدات  $R^-$  وتسمى واهبات تنافسية competent donors. ولذلك لو أن مزرعة  $R^+ / lac^-$  خلطت مع مزرعة  $R^- lac^+$  ثم خفف المخلوط ألف مرة بعد الخلط بقليل فلن يحدث ازدواج بين الخلايا بعد هذا التخفيف ويكون عدد الهجن أى الخلايا المعاد صياغتها recombinants بنسبة ٠,٢% من العدد الابتدائى للخلايا  $R^+$ .

بعد حدوث الانتقال، فى حالة حدوثه، فإنه يمكن إضافة عدد كبير من الخلايا المستقبلية  $R^-$  بتركيز يسمح بحدوث ازدواج سريع للخلايا rapid pair formation وهكذا ينتشر البلازميد  $R^-$  بسرعة فى الخلايا المستقبلية. حركات انتقال البلازميد kinetics transfer أوضحت أن الخلية المستقبلية  $R^-$  والتى إستقبلت البلازميد  $R^-$  فإنها فى التو واللحظة تكون قادرة على نقل البلازميد. هذه الظاهرة المسماة بتثبيط الخصوبة fertility inhibition تكون نتيجة لوجود ونشاط مانع عديد تحت الوحدات multisubunit repressor وهذا المانع يتحكم فى تكوينه جينين إسمهما tow fin genes  $fin$ . هذا المانع يعمل على العامل operator ويمنع نسخ الجينات اللازمة لعملية الانتقال. غالبية البلازميدات  $R^-$  لها مانع نشط  $fin$  والذى يعمل



لخفض تكرارية الانتقال إلى درجة الانتقال منخفضة. عند إدخال IS3 في  $0$   $fin$ ، فإن  $F$  ينقصها أحد الجينين  $fin$  وتبعاً لذلك فإن النظام الخاص بالنقل ينسخ تركيباً *transcribed constitutively*. في حالة أغلب البلازميدات  $R$  عند حدوث ازدواج بين خلية واهبة وخلية مستقبلة فإنه يحدث منع المنع *derepression* أى لا يحدث منع لأن المانع غائب في الخلية المستقبلة، ولذلك فإن الخلايا المستقبلة تنقل لتوها وفي لحظتها  $R$  إلى خلية أخرى وهكذا. بمرور الزمن يتم تخليق مانع وتقل الخصوبة. العامل *operator* في  $F$  يمكنه أن يلتصق ظاهرياً بموانع  $R$  لأن انتقال  $F$  يقل بوضوح في وجود البلازميد  $R$  وكما هو متوقع فعند احتواء بلازميد  $R$  على جين  $fin$  معيب أى غير نشط أى غير فعال *a defective fin gene* فإن انتقال  $F$  لا يقل ولا يثبط.

يجب ملاحظة أنه بالرغم من أن تثبيط الخصوبة خاصة عامة في بلازميدات  $R$  ولكنها ليست خاصة لجميع البلازميدات  $R$  أى أن بعض بلازميدات لا توجد فيها هذه الخاصية.

### الجينات الخاصة بالبلازميد $F$

#### *tra* Gene of $F$ plasmid

في الجزء السابق إتضح أن الانتقال يتم التحكم فيه أو تنظيمه بواسطة الجينات  $fin$  وظائف الانتقال أى الجينات المتحركة في الانتقال *transfer* توجد في أوبيرون ويسمى *tra*. ويوجد في *tra* عدد من الجينات وهى على سبيل المثال جين *tra A* والتي تتحكم في تكوين بيلين *pilin* والجينات *tra, B, C, E, F, G, H*, *K, L, Q, U, V, W* تتحكم في تكوين الهديب *pilus*. جينات أخرى تكون لازمة لعملية الإزدواج (خلية واهبة وخلية مستقبلة) والانتقال الزنادى *triggering* *transfer* والانتقال الحقيقى *actual transfer* والقطع عند منطقة منشأ الانتقال *ori*

T (nicking at the transfer origin *ori T*). وتضاعف أى تكرار دنا من منشأ التضاعف *ori V* (replication origin *ori V*) والتنافر السطحي surface exclusion أى عدم قدرة الخلية  $F^+$  أن تزود مع خلية  $F^+$  أى من نفس التركيب أى إحتواء البلازميد  $F$  وعدم التوافق بين البلازميدات plasmid incompatibility (سيتم شرحه مؤخراً فى هذا الباب). هذه الجينات وجينات أخرى توجد فى الجدول (جدول ١٨) وعلى خريطة البلازميد  $F$  (شكل ١١٩).

جدول ١٨ : بعض جينات البلازميد  $F$  وموقعها ووظائفها.

الوظيفة	الجين
تحت وحدة رئيسية للهديب	<i>tra A</i>
تخليق حيوى وتجميع وتكوين الهديب	<i>tra B, C, E, F, G, H, K, Q, U, V, W</i>
إستقرار الأزواج المتقابلة المتزاوجة stabilization of mating pairs	<i>tra G, N</i>
إنزيم حلزونة DNA helicase	<i>tra H</i>
تنظيم الأوبيرون <i>tra</i>	<i>tra J</i>
بداية إنتقال البلازميد	<i>tra M</i>
التنافر السطحي، تثبيط التلامس والتزاوج mating بين الخلايا المحتوية على $F$	<i>tra S, T</i>
قطع عند <i>ori T</i>	<i>tra Y</i>
موقع قطع ليبدأ تضاعف الحلقة المكروره ونقل دنا	<i>ori T</i>
منشأ تضاعف دنا الحلقي	<i>ori V</i>
تثبيط الخصوبة، <i>fin O</i> ، طفرة فى $F$ ولكن ناتج جين $fin O^+$ يمكن تموينه فى الإنتقال بواسطة بلازميدات أخرى.	<i>fin O, P</i>
عدم التوافق البلازميدى	<i>inc B, C, E</i>

ولذلك تعامل هذه البكتيريا معاملة خاصة لكي تجعلها قابلة للنقل الحيوي، قد تكون هذه المعاملات كيميائية وتسمى نقل حيوي كيميائي chemical transformation أو قد تكون كهربائية وتسمى نقل حيوي كهربائي electrotransformation. آلية تأثير هذه المعاملات على البكتيريا لكي تجعلها قابلة للنقل الحيوي غير معروفة وغير مفهومة. هذه الطرق أساس لكثير من تجارب الهندسة الوراثية والتي تحتاج معاملة دنا معملياً *in vitro* ثم إعادة هذا الدنا المعامل إلى خلية العائل للتكاثر والتكرار.

Some F plasmid genes and sites and their functions

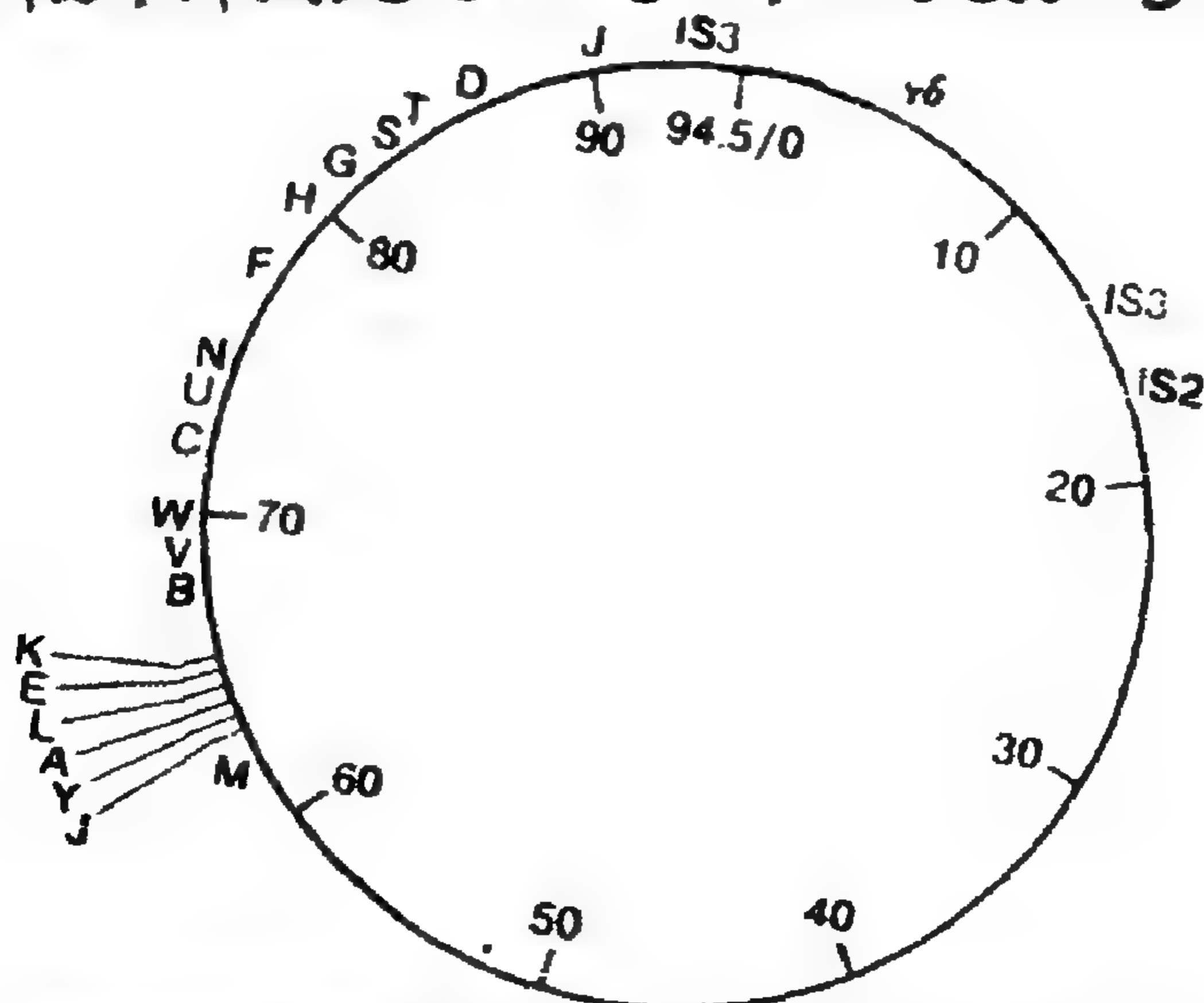
Gene	Function
<i>tra A</i>	Pilin, major subunit of the pilus
<i>tra B, C, E, F, G, H, K, Q, U, V, W</i>	Biosynthesis and assembly of the pilus
<i>tra G, N</i>	Stabilization of mating pairs
<i>tra H</i>	DNA helicase
<i>tra J</i>	Regulation of the <i>tra</i> operon
<i>tra M</i>	Initiation of plasmid transfer
<i>tra S, T</i>	Surface exclusion, inhibition of mating between F-containing cells
<i>tra Y</i>	Nicking at <i>ori T</i>
<i>ori T</i>	Site nicked to initiate rolling circle replication and DNA transfer
<i>ori V</i>	Origin of circular DNA replication
<i>fin O, P</i>	Fertility inhibition, <i>fin O</i> , is mutant in F but the <i>fin O</i> <sup>+</sup> gene product can be supplied in trans by certain other plasmids
<i>inc B, C, E</i>	Plasmid incompatibility



## منع أو تحديد العائل لعملية الانتقال للبلازميد

## Host Restriction in Transfer

تحدث ظاهرة تحديد العائل لعملية الانتقال في الفاج بدرجة كبيرة في الفاج وبدرجة أقل في البلازميدات. ومثال ذلك أن  $F^- lac^+$  لا ينتقل بكفاءة من السلالة K12 إلى السلالة B وذلك في حالة البكتيريا *E. coli*. ولكن في الحقيقة أن الانتقال يحدث ولكن دنا المنقول من السلالة K12 يتم تحطيمه بواسطة إنزيمات متخصصة وهي B-specific restriction nucleases عند دخوله السلالة B. يمكن أن توجد خلايا نادرة العدد جداً من السلالة B يمكن أن يتواجد بها  $F^+ lac^+$  وفي هذه الحالة يمكن نقله إلى خلايا مستقبلية من السلالة B ولكن لا يمكن أن يحدث الانتقال عكسياً إلى السلالة K12. وما يحدث هنا أنه يحدث نقل حلزون واحد من البلازميد إلى الخلية المستقبلة وهذا بدوره لا يهاجم بكفاءة عالية بواسطة إنزيم restriction nuclease ولذلك يبقى، وعند إكمال تكوينه أي تخليقه يصبح به مجاميع ميثيل بسرعة rapidly becomes methylated، وعند حدوث ذلك أي methylation في حلزون واحد فإنه من المحال أن يهاجم بالإنزيم المذكور.



شكل ١١٩: خريطة البلازميد F مقدره بالكيلو قاعدة kilobases. الحروف الكايتال capital تشير إلى منتصف موقع الجين في أوبرون tra. يلاحظ بعض التتابعات الأخرى sequences وهي  $\delta$ , j, IS2, IS3.

## نقل البلازميد معملياً

### *In Vitro Plasmid Transfer*

كثيراً يكون من المرغوب فيه نقل بلازميد غير قابل للإنتقال إلى خلية عائل معين. يمكن نقل دنا طالما أن التركيب الوراثي يسمح بذلك في الخلايا المستقبلة أى تقبل دنا البلازميد. ولذلك يتم عمل إنتخاب وراثي لوجود هذه الصفة في الخلايا المستقبلة لكي تتقبل البلازميد. أخذ البلازميد أو دنا النقي يسمى بالنقل الحيوي أو الإنتقال الحيوي transformation. بعض أنواع البكتيريا قابلة لعملية النقل الحيوي. كثير من أنواع البكتيريا والتي تكون مفيدة في الهندسة الوراثية غير قابلة للنقل الحيوي طبيعياً.

#### النقل الحيوي الكيماوي : Chemical transformation

عند معاملة بعض البكتيريا بكيماويات مناسبة في وجود بيئة مناسبة يمكن أن تسبب هذه المعاملة أن تصبح الخلية قابلة لعملية النقل الحيوي الكيماوي. أكثر الطرق شيوعاً لتحضير خلايا بكتيريا قابلة لأخذ دنا أو البلازميد. competent cell هي بعمل صدمة بمحلول تحتى التركيز لكاتيون الكالسيوم  $Ca^{++}$  hypotonic shock. هذه الخلايا التي تتأثر بهذه المعاملة تسمى بالخلايا القادرة competent cells وخطوات عمل هذه الطريقة كما يلي.

في مرحلة مبكرة من الطور اللوغاريتمي للمزرعة البكتيرية early log phase culture يتم عمل طرد مركزي لهذه الخلايا ثم يعاد تعليقها في الماء أو سائل في صورة معلق في محلول بارد تحتى التركيز من كلوريد الكالسيوم.

عند إضافة دنا إلى الخلايا فإنها تكون معقد دنا كالسيوم calcium-DNA complex والذي يدمص على سطح الخلايا. يتم تدفئة هذه الخلايا لمدة قصيرة وتكون بمثابة صدمة حرارية heat shocked والتي تسمح بنقل دنا إلى الخلية. توجد طريقة أخرى بديلة لتحضير الخلايا القادرة تشمل معاملة الخلايا بواسطة

بولي إيثيلين جليكول (polyethylene glycol (PEG) ودائمي ميثيل أكسيد الكبريت dimethylsulfoxide (DMSO). وفي هذه الحالة معقد دنا-PEG يدمص على سطح الخلية. DMSO يجعل غشاء الخلية منفذ لمعقد دنا-PEG. كلا الطريقتين السابقتين ينتج عنهما زيادة في كفاءة عملية النقل الحيوي وتقدر كمياً بحوالي  $10^2$  × خلية محولة لكل ميكروجرام دنا.

في حالة نقل دنا سواء من البلازميد أو الفاج قادر على التضاعف أي التكرار إلى خلية مستقبلية فإن إمكانية تضاعفها أي تكرارها تبقى دائماً ثابتة في الخلايا المستقبلية. لو أنه تم نقل شظية من دنا خطي linear إلى خلية بكتيرية إ. كولاي، فإن هذه الشظية يتم هضمها بواسطة إنزيم نيوكليز خارجي V أي exonuclease V.

توجد تجربة مميزة لعملية نقل بلازميد R يحتوي على مقاومة للتراسيكلين ( $Tet^r$ ) إلى خلية بكتيرية حساسة للتراسيكلين ( $Tet^s$ ) وذلك بالنقل الحيوي بطبيعة الحال ثم زراعة خلايا البكتيريا المستقبلية على بيئة آجار مغذي محتوية لتراتسيكلين. جميع مستعمرات البكتيريا المقاومة للتراتسيكلين تحتوي على بلازميد. كانت المقارنة في هذه التجربة هي زراعة الخلايا العادية فقط أو دنا فقط. كانت المقارنة خالية من أي نمو بالطبع إلا في حالة واحدة وهي وجود طفرة ذاتية لمقاومة التتراتسيكلين spontaneous  $Tet^r$  mutants. وبالطبع لأن معدل حدوث الطفرات الذاتية في الخلايا والمزارع المقاومة للتراتسيكلين هي أقل من  $10^{-8}$  فلم تحدث طفرات ونمو في المقارنة. ولذلك لو أن كمية من دنا البلازميد تم إضافتها للخلايا البكتيرية بهذه الطريقة وبحيث أن جميع الخلايا البكتيرية تأخذ دنا أي تصبح خلايا قادرة فإن قليل من هذه الخلايا تصبح حساسة للتراتسيكلين أي أن نسبة الخلايا الحساسة للتراتسيكلين تكون منخفضة.



### النقل الحيوي الكهربائي Electrotransformation:

يمكن للخلايا أن تأخذ دنا خارجي exogenous DNA بواسطة النقل الحيوي الكهربائي electrotransformation. عند تعريض الخلايا لتيار كهربائي أي حقل كهربائي، يحدث قطبيه في الغشاء البلازمي، ويحدث جهد كهربائي عبر الغشاء. لو أن الجهد الكهربائي تعد مستوى معين يسمى مستوى المدخل أو مستوى البداية exceeds threshold level، تتكون ثقب صغرة وقتية في الغشاء وتجعل الخلايا منفذة للجزيئات الكبيرة الحجم المضافة خارجياً للخلايا ومنها دنا. أخذ دنا خارجي بواسطة التثقيب الكهربائي electroporation يسمى النقل الحيوي الكهربائي Electrotransformation بالرغم من أن التثقيب الكهربائي يحتاج إلى جهاز خاص، فإن له مميزات عديدة عن النقل الحيوي الكيماوي:

١ - تحضير الخلايا سهل وسريع. تفصل مزرعة من الخلايا بشدة (لإزالة الملاح من البيئة) ثم يعاد توزيعها ونشرها في الماء أو سائل أي تصبح في صورة معلق في محلول منخفض القوة الأيونية low ionic strength.

٢ - كفاءة النقل الحيوي الكهربائي يزيد مرات عديدة عن طريق النقل الأخرى كفاءة. التثقيب الكهربائي في البكتيريا إ. كولاى أو *Salmonella typhimurium* ينتج عنها  $10^{-1}$  إلى  $10^{-10}$  خلايا محولة كهربائياً electrotransformation لكل ميكروجرام دنا بلازميدي.

٣ - كفاءة النقل الحيوي لكهربائي للبكتيريا إ. كولاى و *S. typhimurium* مرتفعة جداً حتى أنه يمكن نقل البلازميدات مباشرة بين الخلايا بدون تنقية دنا قبل الإستعمال.

٤ - مدى النقل الحيوي الكهربائي أقل حسابية بالنسبة لحجم ونقاء واهبات دنا بالنسبة لطرق النقل الحيوي الأخرى. حيث أن النقل يحدث في أحجام

كبيرة نسبياً ودرجة نقاوة قليلة نسبياً بالمقارنة بالطرق الأخرى. النقل الحيوى الكهربائى لبلازميدات زائدة الحزنة أو مرتخية تتراوح أحجامها بين ٢-٤ كيلو قاعدة kb يحدث بكفاءة عالية.

٥ - مدى واسع من أنواع وأجناس البكتيريا يمكن أن ينقل حيويًا بواسطة التثقيب الكهربائى، يشمل ذلك بكتيريا عديدة يحدث لها تحويل بصعوبة أى قابلية للنقل الحيوى بصعوبة أو لا يحدث لها تحويل إطلاقاً أى لا يحدث لها قابلية للنقل الحيوى إطلاقاً، بالطرق الأخرى (تحويل مقصود به قابلية للنقل الحيوى).

جهاز التثقيب يولد نبضة تيار كهربائى سريع عال الفولت خلال أنبوبة الكوارتز cuvette المحتوية على الخلايا مخلوطة مع دنا. يتم تخزين الفولت فى capacitor ويترحرر على هيئة نبضة كهربائية والتى decays exponentially.

الفولت الابتدائى initial voltage والذي يرمز له  $V_0$  يحدث له تحلل decays خلال الزمن تبعاً للمعادلة الآتية:

$$V_t = V_0 e^{-t/\tau}$$

$$\tau = R \times C$$

R عبارة عن المقاومة بالأومات (ohms)  $(\Omega)$ .

C عبارة عن capacitance بالفارادس farads.

t ثابت الزمن بالثوان.

$\tau$  عبارة عن الزمن اللازم للفولت لى يتحلل إلى  $1/e$  (أى حوالى ٣٧%) من

الفولت الابتدائى.  $\tau$  تكون متناسبة مع طول فترة النبضة الكهربائية pulse.

فى حالة الظروف التى تستخدم لعمل تثقيب كهربائى لبكتيريا القولون فإن  $\tau$

المثالى. يكون ٤-٥ مللى ثانية msec.

جهد الفولت voltage potential خلال غشاء خلال غشاء الخلية يكون متناسب

مع منحدر أى تدرج الفولت voltage gradient بين الإلكترودين ويسمى أيضاً بالحقل الكهربائى (E).

$$E = V / D$$

حيث أن d المسافة بين الإلكترودين أى هى عبارة عن طول الممر path length للكيوفيت cuvette أى عبارة عن طول المسار فى أنبوبة الكوارتز. ولذلك فإن E و  $\tau$  أهم متغيرات كهربائية تؤثر على التنقيب الكهربائى. لو أن E صغيرة جداً فإن جهد الفولت عبر الغشاء يكون صغيراً جداً ولا يؤثر على الغشاء البلازمى ولذلك لا يحدث التنقيب الكهربائى أو الإنفاذ الكهربائى. لو أن E مرتفعة جداً فإن غشاء الخلية يختل أو يفسد ولا يرجع مرة أخرى لحالته الطبيعية أى يكون الاختلال غير عكسى. يمكن ضبط E بتغيير الفولت أو تغيير طول المسار فى أنبوبة الكوارتز cuvette. تكون الدرجة المثلى للتنقيب الكهربائى للبكتيريا إ. كولاى والبكتيريا *S. typhimurium* أى الدرجة المثلى لـ E بين ١٢,٥ إلى ٢٠ كيلو فولت لكل سم kV/cm. ولكن الدرجة المثالية للبكتيريات الأخرى تكون مختلفة عن ذلك.

## تضاعف أى تكرار أى تكاثر البلازميد

### Plasmid Replication

يتكاثر البلازميد فقط داخل خلية العائل وكل طراز من البلازميد يجب أن يحتوى على نفس التركيب أى نوع التتابع من نيوكليوتيدات دنا. يتضاعف أى يتكاثر البلازميد بطريقة منظمة رتيبة محكمة *ordered manner* كما فى المفاجات، على أى حال، يوجد اختلافات شاسعة فى كل من الإنزيمات وأيضاً فى آلية تضاعف أى تكاثر دنا البلازميد كما سيتم شرحه فى الأجزاء الآتية:

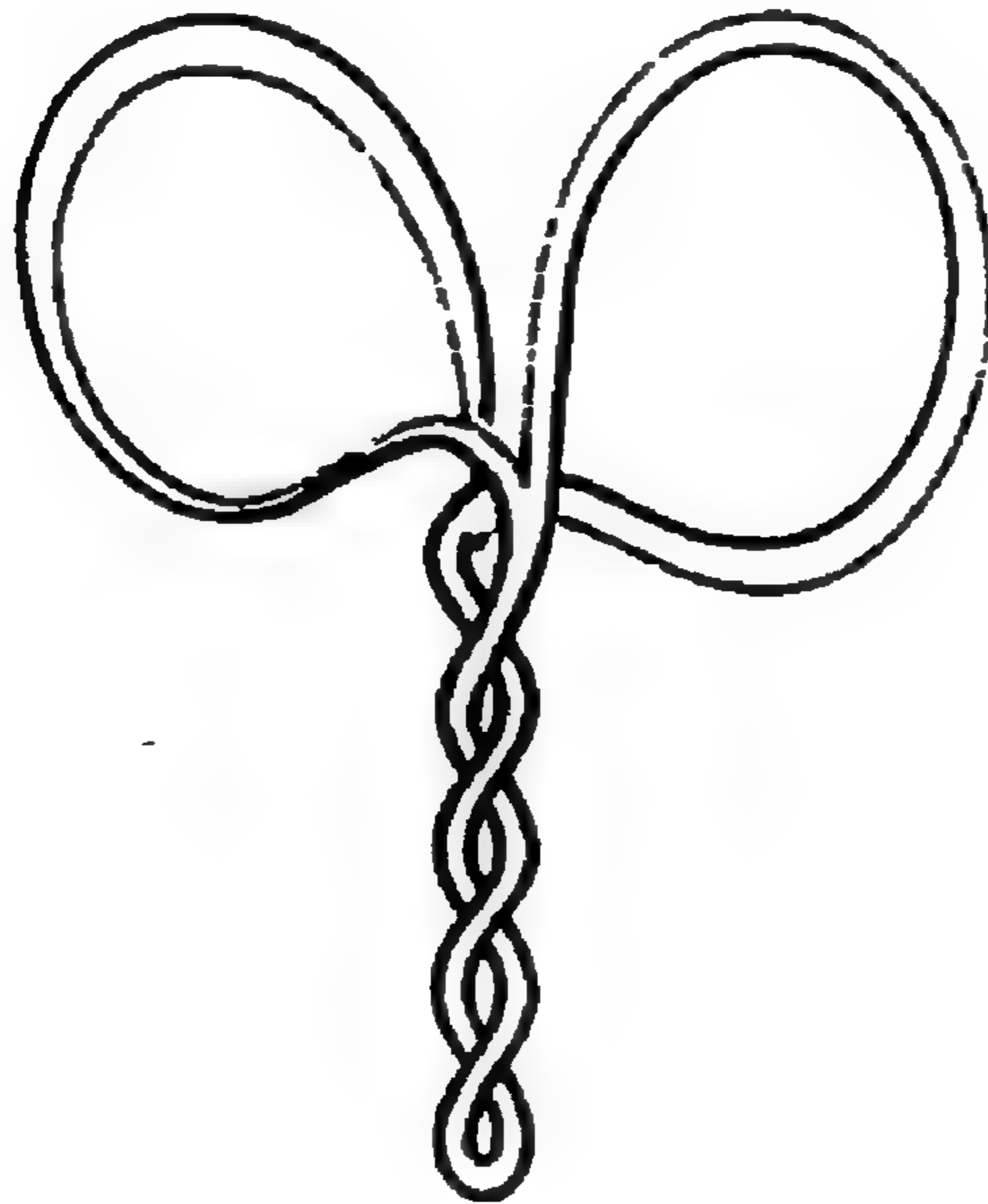


## استخدام بروتينات العائل في تضاعف البلازميد

## Use of host proteins in plasmid replication

تعتمد البلازميدات بشدة على البروتين الذي يستخدم في التكاثر على العائل أي تستخدم بروتين العائل. يعتبر دنا بول ٣ (DNA Pol III) البروتين الرئيسى اللازم لتضاعف كروموسوم البكتيريا *E. coli*، ولكن بعض البلازميدات تستخدم البروتين دنا بول ١ (DNA Pol I) بدلاً منه. مثال ذلك، في طفرات *pol A* والتي لها مستوى منخفض جداً من Pol I فإن البلازميد F يتكاثر أي يتضاعف طبيعياً ولكن البلازميد ColE1 يفشل في التضاعف، وذلك لأن تضاعف دنا الخاص بـ F يستخدم Pol III ولكن ColE1 يستخدم Pol I. بعض البلازميدات تستخدم نواتج جين العائل تماماً أي معتمدة عليه كلية في هذا الشأن. مثال ذلك أنه يمكن تكرار ColE1 في المعمل *in vitro* بإضافة بروتين دنا ColE1 نقى إلى مستخلص الخلايا المجهز من خلايا لا تحتوي على ColE1 أو أي بلازميد آخر. تكاثر بلازميدات أخرى يحتاج إلى بعض نواتج جين موجود بالبلازميد *some plasmid-encoded gene products*. مثال ذلك حالة البلازميدات *F' lac* تحمل طفرة حساسة للحرارة في F وقد تم عزلها وهي غير قادرة على التضاعف عند درجة ٤٢ مئوية ولذلك فإن عند هذه الحرارة فإن البلازميد *F' (Ts) lac* يفشل في التكاثر أي التضاعف وبالتالي ينعزل بسرعة من العشيرة نتيجة لانقسام الخلايا البكتيرية. جميع البلازميدات التي تم فحصها الآن تتضاعف أي تكرر نفسها بطريقة شبه محافظة *semiconservatively* وتستمر حلقية خلال دورة التضاعف. توجد اختلافات جوهريّة، على أي حال، في طرز أو طريقة التضاعف بين البلازميدات المختلفة. مثال ذلك أن بعض البلازميدات تتضاعف في اتجاه واحد *unidirectionally* والأخرى تتضاعف في اتجاهين *bidirectionally* يتضاعف البلازميد RK6 أولاً في اتجاه واحد ثم بعد ذلك في الاتجاه العكسي بالنسبة للأصل الواحد. عند تضاعف البلازميدات في اتجاهين فإن طريقة إنهاء التضاعف تكون بإحدى

طريقتين. أحد الطريقتين يحدث عند اصطدام الشوك النامية growing forks collide. والطريقة الثانية أن بعض البلازميدات لها موقع إنتهاء ثابت حيث أنه فى بعض الأحيان يتم الوصول إلى هذا الموقع بواسطة شوكة نامية واحدة وقبل أن تصل إليها الشوكة النامية الأخرى. فى أغلب البلازميدات التى تم دراستها بعناية يحدث التضاعف بواسطة ما يسمى طراز الفراشة أو أذن الأرنب butterfly or rabbits ear mode (شكل ١٢٠). فى هذا النوع يكون الجزيء أى البلازميد المتضاعف جزئياً محتوى على أجزاء متضاعفة غير ملتفة untwisted replicated portions كما هو المعتاد فى حالة تضاعف  $\theta$  وجزء غير متضاعف زائد الحلزنة supercoiled unreplicated portion. عند إكمال حدوث التضاعف فإن إحدى الحلقتين تنشق لتفصل الحلقتين البنويتين daughter. نتيجة دورة واحدة من التكاثر هى تكوين جزيء مقطوع وجزيء آخر زائد الحلزنة. بعد ذلك يحدث للجزيء والمقطوع إلتئام وبعد فترة يصبح زائد الحلزنة.



شكل ١٢٠: يوضح تركيب جزيء الفراشة أو أذن الأرنب.

## ضبط عدد النسخ Control of copy number :

إتضح فيما سبق أن البلازميدات تستعمل طبيعياً أغلب آلية التضاعف الخاصة بالعائل replication machinery of the host. كل نوع من البلازميد، على أى حال، يمتلك جيناته الخاصة والتي تنظم سرعة بدء التضاعف أى التكرار أى التكاثر وبالتالي تحدد عدد البلازميدات لكل خلية. يمكن تصنيف البلازميدات على أساس عدد البلازميدات فى كل خلية إلى بلازميدات قليلة العدد فى الخلية stringent or low copy number وفى هذه الحالة يكون عدد البلازميدات محدود بدرجة كبيرة بلازميد أو بلازميدين لكل خلية وبلازميدات كثيرة العدد فى الخلية relaxed or high copy number وفى هذه الحالة يكون عدد البلازميدات يتراوح بين ١٠-١٠٠ بلازميد لكل خلية. النقل الحيوى transformation للنوعين السابقين من البلازميدات قد تم إستعماله لتوضيح أن عدد النسخ يتم تحديده وتنظيم تخليقه وذلك عن طريق التحكم فى سرعة بدء تخليق دنا rate of initiation of DNA syntythesis. لو أن مزرعة خالية من البلازميدات تم عمل نقل حيوى transformed بواسطة دنا بلازميدات مع النوع قليلة العدد (النسخ) وبتركيز مدروس عملياً من دنا بحيث أن الخلية الواحدة لا تستقبل أكثر من نسخة واحدة من البلازميد أى بلازميد واحد، فإن البلازميد سوف يكرر نفسه مرة أو مرتين قبل إنقسام الخلية. لو أن الخلية تم عمل نقل حيوى لها بواسطة جزيء مفرد من دنا البلازميد (نسخة واحدة) وهذا البلازميد كثير العدد (عديد النسخ) فإن دنا البلازميد يكرر نفسه مرات عديدة حتى الوصول إلى عدد النسخ الكثير والخاص بهذا البلازميد داخل الخلية الواحدة.

أحد الآليات لتنظيم عدد النسخ من البلازميد داخل الخلية الواحدة هو أن البلازميد يحتوى مانع repressor ينظم بالسالب negatively regulates منشأ أو بداية التكرار أى التضاعف. كيف يحدث ذلك بالتفصيل لكى يحدث إستمرارية فى عدد النسخ من جيل إلى آخر. نفترض أن نشاط المانع يعتمد على تركيزه. ولذلك



فإنه عندما تنمو الخلية في الحجم يقل تركيز المانع أي يصبح مخفف بدرجة كبيرة ولذلك لا يحدث تثبيط لعملية تكرار أي تضاعف دنا، حيث أن التركيز المنخفض من المانع يمنع نشاطه. عند هذا الحد وبعد تضاعف دنا البلازميد أو البلازميد فإنه يوجد ضعف العدد الابتدائي للجينات المانعة ولذلك وأيضاً نتيجة لتخليق البروتين فإن تركيز المانع أيضاً يتضاعف مسبباً منع التضاعف أي التكرار. يحدث أيضاً نفس التتابع من الأحداث في حالة وجود نسخة واحدة من بلازميد عديد النسخ high-copy-number-plasmid، حيث أن التكرار يستمر حدوثه يتكون المانع بتركيز كاف مسبباً وقف عملية التخليق أي التكرار. كيف أن هذا التفسير يفسر الاختلاف في عدد النسخ؟. تفسير ذلك هو أنه في حالة البلازميدات العديدة النسخ فإن المنع التام أي التثبيط للتخليق لتكرار دنا التام يحتاج إلى تركيز مرتفع من المانع عنه في حالة البلازميدات القليلة النسخ، وهكذا عندما يكون عدد البلازميدات لكل خلية مرتفع فإن الجرعة الجينية gene dosage تكون مرتفعة بدرجة كافية لحدوث التثبيط.

توضح التجربة التالية أن كل بلازميد يتحكم ويضبط عدد النسخ الخاصة به. تم بناء بلازميد هجين pSC134 was constructed pSC134 والذي يتكون من خليط من نسختين كاملتين لبلازميدين مختلفين هما ColeE1، pSC101 (وهذا البلازميد الأخير pSC101 مشتق من البلازميد R). تحت الظروف المستعملة في هذه التجربة، فإن عدد النسخ لهذين البلازميدين تكون ١٦، ٦ (شكل ١٢١). البلازميد ColeE1 يتكاثر في الخلية  $pol A^+$  ولكنه غير قادر على التكاثر في طفرة في الخلية والتي تركيبها  $pol A^-$  ويصل في الغدد إلى ١٦ بلازميد في الخلية  $pol A^+$ . أما البلازميد pSC101 فإنه قادر على التكاثر في الخلية  $pol A^+$  والخلية الطفرة  $pol A^-$  ويصبح عدده في الخلية الواحدة ٦.

أما الأرقام في الشكل الموضوعة في مربع وهي ١، ٢، ٣ فهي تدل على أرقام الحالات الآتية:

١ - فى الخلايا البرية الخلايا العادية أى  $pol A^+$  فإن البلازميد pSC134 يتكاثر من بداية التضاعف replication origin للبلازميد ColE1 ولذلك يصل عدده إلى ١٦ نسخة فى الخلية الواحدة مساوياً فى ذلك لعدد البلازميدات ColE1 فى الخلية الواحدة.

ولذلك فإن صفة منشأ البلازميدات عديدة النسخ تكون سائدة على صفة البلازميدات قليلة النسخ وهى ٦.

٢ - فى حالة عمل نقل حيوى transformation للبلازميد الهجين pSC134 إلى داخل خلية غير برية أى طفرة  $pol A^-$ . فنه من المعروف كما سبق أن البلازميد ColE1 لا يمكن أن يتكاثر فى خلية طفرة  $pol A^-$ ، ولذلك فإنه يتم استخدام منشأ التضاعف للبلازميد pSC101 ويصبح عدد النسخ ٦ وهو الرقم الخاص بالبلازميد pSC101. هاتين النتيجةين من رقم ١، ٢ توضح أن عدد نسخ البلازميد مرتبط تماماً بنوع منشأ التضاعف replication origin المستعمل. إذا كان منشأ التضاعف خاص بالبلازميد ColE1 يكون ١٦ نسخة إذا كان منشأ التضاعف خاص بالبلازميد pSC101 يكون ٦ نسخ.

٣ - لو أنه تم نقل البلازميد pSC101 نقلاً حيوياً إلى خلية بكتيريا تحتوى ١٦ نسخة من البلازميد pSC134 بواسطة نقل حيوى بواسطة كلوريد الكالسيوم فإن البلازميد pSC101 لا يمكنه التكاثر أى التكرار. يرجع سبب عدم التكرار أنه يتم تخليق مثبط بواسطة البلازميد الهجين pSC134 يسبب تثبيط أى منع تضاعف أى تكرار البلازميد pSC101.

ملخص لشرح نتائج التجارب السابقة كما يلى. عندما يكون عدد النسخ أقل من ٦ فإن كل من منشأ التضاعف أو التكرار فى حالة pSC101 وأيضاً منشأ التضاعف أو التكرار فى حالة ColE1 سيكونان نشيطين ولذلك يسبب زيادة عدد نسخ البلازميدات فى الخلية الواحدة.

لو أن عدد النسخ أكبر من ٦ فإن الأصل pSC101 لن يكون نشيط بل يكون خامل لأن تركيز المثبط pSC101 يكون أعلى من مستو التنشيط الخاص به أى مثبط تماماً له. تكرر pSC101 سيستمر، ولكن لو كانت ذاتية التنظيم self-regulated، عامة لن يتجاوز التركيز ذلك المنتج بواسطة عدد النسخ. سيظل المنشأ أو الأصل للتكرار لـ ColE1 نشط حتى يصل عدد النسخ إلى ١٦ أو حوالى ١٨ فى لا الخلية الواحدة. فى حالة الطفرة *pol A* فإن البلازميد ColE1 لا يمكنه التضاعف وتبعاً لذلك فإن عدد النسخ يتم التحكم فيه تماماً وكنية بواسطة تركيز المثبط لبلازميد pSC101 وهكذا لن يتعدى قيمته الطبيعية أى معدلته العادى أى العدد العادى للبلازميدات. هذا التوضيح ثابت فى تجارب أخرى مختلفة عديدة وينطبق عليها نفس التفسير والذي يفسر ذلك دور (أو موديل) المانع repressor model فى تفسير آلية التنظيم لعدد البلازميدات فى الخلية الواحدة.

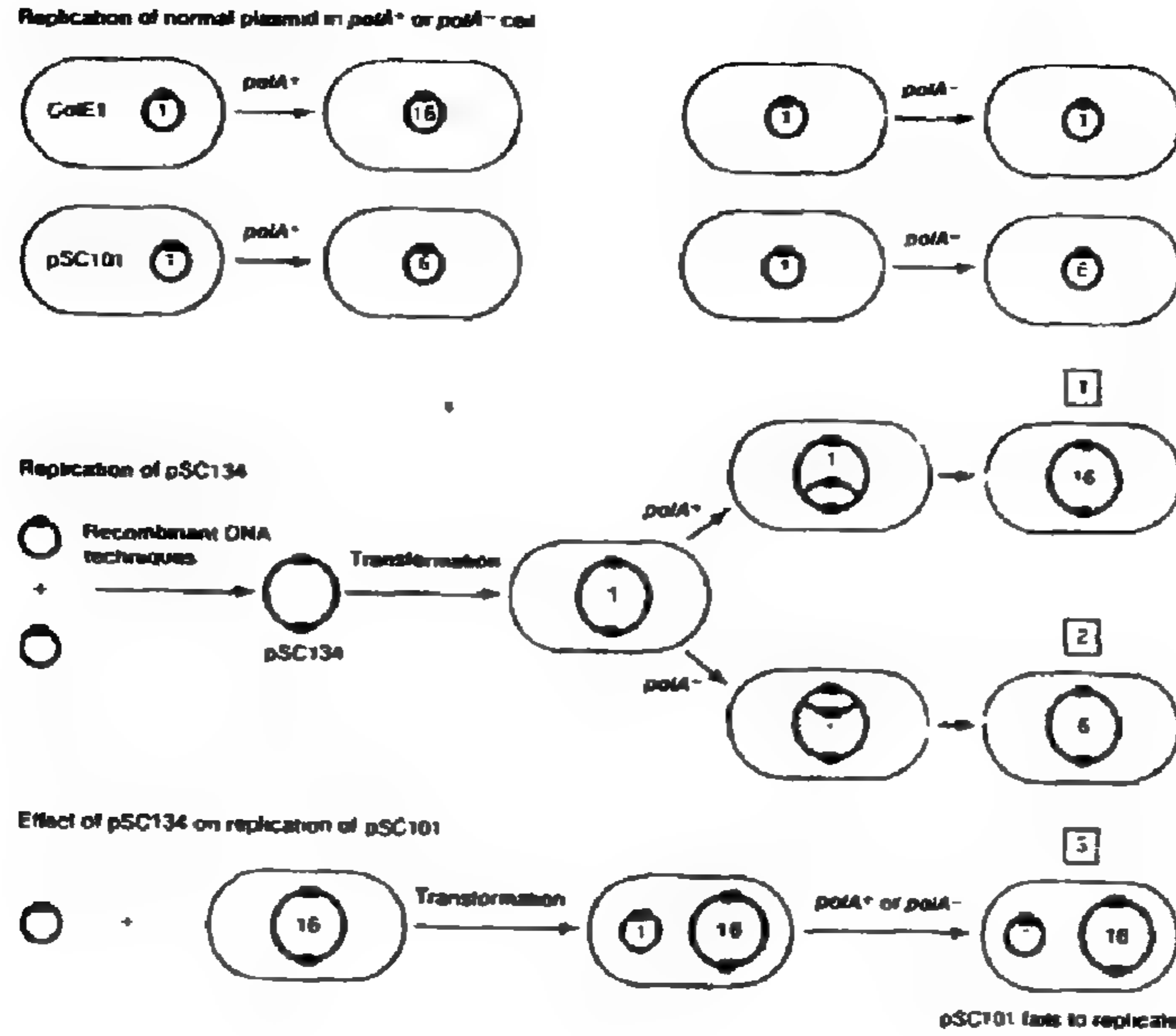
#### The repressor model of copy-number regulation

النبذة التالية الهامة يجب فهمها وأخذها فى الاعتبار وهى الخاصة بموديل المانع أى آلية عمل المانع. فى حالة سلالة تحتوى على طراز بلازميدى واحد فإن جميع البلازميدات فى الخلية الواحدة تكون متماثلة تماماً وهكذا فإن جزيء المانع (لغالبية البلازميدات) لا يمكنه التمييز بين جزيء دنا البلازميد والآخر فى نفس الخلية الواحدة. وهكذا، عندما يكون تركيز المانع منخفض بدرجة كافية بحيث أن جميع جزيئات دنا أى البلازميدات لا يمكن كبحها أى منعها أى تثبيطها أى أن البلازميدات تتضاعف أى تتكرر فإنه يمكن سحب عدد منها إعتباطياً من العشيرة.

أى بلازميد أصلى يتكاثر ويكون بلازميد بنويين فإن كل بلازميد بنوى يمكن أن يتكاثر مرة أخرى ومرات عديدة ليعطى نفس التركيب مماثل تماماً للبلازميد الأصلى. ولذلك فى أى حالة فإن جزيء البلازميد المختار للتكاثر أى التكرار



يمكن إختياره بواسطة الإلتخاب العشوائى random selection من العشيرة الكلية للبلازميدات ويكون له نفس التركيب لنسخ البلازميدات الأخرى.



شكل ١٢١: يوضح تضاعف البلازميدات ColE1، pSC101، pSC134 أى تكرارها أى تكاثرها لكل خلية بكتيرية واحدة. الدائرة السوداء هى منشأ تضاعف ColE1 والمربع الأسود هو منشأ تضاعف pSC101. الأرقام ١، ٦، ١٦ تدل على عدد النسخ من البلازميد لكل خلية. الأرقام ١، ٢، ٣ داخل مربعات تدل على ما هو مكتوب لأرقام الشرح الخاصة بهذا الجزء. (أنظر الشرح رقم ١، ٢، ٣).

### زيادة عدد نسخ البلازميدات فى الخلية الواحدة (تكبير البلازميدات)

#### Plasmid Amplification:

تظهر بعض البلازميدات عديدة النسخ ظاهرة تسمى التكبير .amplification فى حالة إضافة مثبط للبروتين مثل كلورامفينيكول إلى مزرعة بكتيريا حاوية للبلازميدات، فإنه يحدث تثبيط أثناء البدء فى تضاعف الكروموسوم ولكن بالرغم من ذلك يستمر البلازميد فى التضاعف أى التكاثر حتى يصل عدد البلازميدات

لكل خلية ألف أو أكثر. يتم تثبيط تضاعف دنا البكتيري لأن كل مرة عند بداية تضاعف دنا الكروموسوم يتم الإحتياج إلى بروتين جديد. لو أن البلازميد يستعمل فقط بروتينات التضاعف البكتيرية الثابتة *stable bacterial replication protein* أو بروتينات ثابتة مشفرة بالبلازميد *stable plasmid encoded proteins* فإن تخليق دنا البلازميد يمكن أن يستمر. بالإضافة إلى ذلك لأن مانع عدد نسخ البلازميد *plasmid copy-number repressor* أى البروتين المانع لتكاثر البلازميدات فى الخلية يعتبر مشط معتمد على التركيز، وحيث أن المانع لا يمكنه أن يتراكم فى غياب تخليق البروتين فإن تضاعف البلازميد أى تكاثره يكون بدون تنظيم أو قيادة أى غير محكوم *unregulated* وهكذا يصل عدد نسخ البلازميدات فى الخلية الواحدة ألف أو أكثر.

طريقة التكبير للبلازميدات تعتبر طريقة ملائمة لزيادة كمية دنا البلازميدات والذي يمكن عزله من مزارع بكتيرية. وقد إستعملت طريقة التكبير بكثرة فى الهندسة الوراثية قبل إكتشاف وإستخدام وتطويع إستخدام الخلايا ذات العدد الكبير من نسخ البلازميدات طبيعياً دون تكبير وأيضاً قبل أن تكون طرق تنقية البلازميدات المحسنة المتطورة بدرجة هائلة متاحة. أى الآن لا يستخدم التكبير فى الهندسة الوراثية وتستخدم سلالات من البكتيريا تحتوى كل خلية على عدد كبير من نسخ البلازميدات طبيعياً كما تستخدم أيضاً طرق تنقية البلازميدات الحديثة المتطورة بدرجة هائلة.

#### **عدم التوافق فى البلازميدات: Incompatibility:**

أزواج البلازميدات (زوج من البلازميدات أى إثنين) القريبة من بعضها وراثياً بدرجة كبيرة لا يمكن أن تبقى ثابتة فى خلية واحدة. وتسمى هذه البلازميدات بأنها غير متوافقة *incompatible*. موديل المانع السابق شرحه والخاص ببداية أى نشوء تضاعف أى تكاثر البلازميدات يشرح أيضاً هذه الظاهرة.

بافتراض أن الخلية تحتوي على بلازميدين ولنفترض أنهما  $F$ ،  $ColE1$  وأنها تحتوي موانع مختلفة. تكرار أي تضاعف أي تكاثر كل طراز من بلازميد يبدأ ويستمر مستقل عن الآخر لأن مانع طراز لن يؤثر على الطراز الآخر أي مانع الطراز أو النوع  $F$  لن ينظم تكاثر الطراز الآخر  $ColE1$  ولذلك فإن  $F$ ،  $ColE1$  يكونان متوافقان، وبقول آخر يمكن وضعها بأنهما يتبعان مجاميع عدم توافق مختلفة *different incompatibility groups*.

فافتراض أن الخلية تحتوي على بلازميدين ولنفترض أنهما  $F$ ،  $ColE1$  وأنها تحتوي موانع مختلفة. تكرار أي تضاعف أي تكاثر كل طراز من بلازميد يبدأ ويستمر مستقل عن الآخر لأن مانع طراز لن يؤثر على الطراز الآخر أي مانع الطراز أو النوع  $F$  لن ينظم تكاثر الطراز الآخر  $ColE1$ . ولذلك فإن  $F$ ،  $ColE1$  يكونان متوافقان، وبقول آخر يمكن وضعها بأنهما يتبعان مجاميع عدم توافق مختلفة *different incompatibility groups*.

يختلف الوضع تماماً في حالة البلازميدين  $A$ ،  $B$  حيث أن الموانع الخاصة بهم إما أن تكون متماثلة أو متشابهة بدرجة كافية بحيث أن المانع الخاص بـ  $A$  يمكنه تنظيم تكرار أي تكاثر  $B$  والعكس صحيح. لو افترضنا أن خلية تحتوي نسخة واحدة من  $A$  وأخرى من  $B$  وأن هذه الخلية تنمو وتكبر بدرجة كافية بحيث أن بداية التضاعف أي التكاثر يمكن ملاحظتها (شكل ١٢٢). لأن نسخ البلازميدين تم إختيارها إعتباطياً أي عشوائياً للتضاعف فإن نتيجة التضاعف الأول هو وجود خلية تحتوي إحدى الحالتين نسخة من  $A$  ونسختين من  $B$  أو نسخة من  $B$  ونسختين من  $A$ . عند حدوث التضاعف أي التكرار الثاني فإن كل خلية ستحتوي أربعة بلازميدات ولكنها تعتمد على البلازميد المتضاعف المتكاثر ولذلك يكون التركيب إما  $3B$  و  $1A$  أو  $2B$  أو  $2A$  أو  $1B$ ،  $3A$ . عند هذا الحد فإن الخلية التي تحتوي على ضعف العدد الابتدائي للبلازميدات يمكنها أن تنقسم. تركيب البلازميد في الخليتين البنويتين سيكون أحد الحالات الآتية:



١ -  $3B$ ،  $1A$  تصبح خلية  $1B + 1B$  وخلية  $1A + 1B$ .

٢ -  $2A$ ،  $2B$  تصبح أحد الإحتمالين.

الإحتمال الأول خلية  $1A$ ،  $1A$  وخلية أخرى  $1B + 1B$ .

الإحتمال الثانى خلية  $1B$ ،  $1A$  وخلية أخرى  $1A$ ،  $1B$ .

٣ -  $3A$ ،  $1B$  تصبح خلية  $1B + 1A$  وخلية  $1A + 1A$ .

لاحظ أن الطرازين المكنين من الخلايا هي  $(1A, 1A)$  وأيضاً  $(1B, 1B)$  تحتوى على نوع واحد فقط من البلازميدات والخلايا البنوية التى تم الحصول عليها من هذه الخلايا بالطبع ستستمر لتحتوى نوع واحد فقط من البلازميدات. فى الحالات الأخرى وحيث تحتوى الخلية الواحدة على بلازميدين مختلفين  $A$ ،  $B$  فإنه نتيجة لإنقسامها سيكون ٥٠% من النسل الناتج ينتج خلايا بنوية تنقصها أحد البلازميدين أى تكون بها  $1A + 1A$  أ، بها  $1B + 1B$ . ولذلك فإنه عند البداية بخلية بكتيرية واحدة تحتوى على بلازميدين متوافقين  $1A + 1B$  فإنه عند الإنقسام وبعد إقسامات عديدة يكون نسل هذه الخلية محتوى على خلايا بها طراز واحد من البلازميد  $1A + 1A$  أ،  $1B + 1B$  وهكذا فإن هذه الخلايا الأخيرة تزيد عشيرتها مع كل إنقسام وكل جيل للبكتيريا. أى أن النسبة المئوية للنسل المحتوى على بلازميدين من نفس الطراز  $A$ ،  $B$  ستزداد مع كل جيل. وهكذا تفسير عدم التوافق incompatibility يكون نتيجة لما يأتى:

١ - كلا البلازميدين  $A$ ،  $B$  لهما مانع مشابه.

أ - الانتخاب العشوائى للبلازميدات أثناء تكاثرها أى تكرارها أو تضاعفها.

مئات البلازميدات قد تم تصنيفها إلى أنواع مختلفة من مجاميع عدم التوافق incompatibility groups. هذا التصنيف له أهمية لأن أفراد أى خلايا المجموعة الواحدة تكون ذات أصل نشوء وتطور واحد أى أنها متشابهة تطورياً من ناحية النشوء والتطور وخاصة بالنسبة للصفات الخاصة بوظائف التكاثر أى التكرار أى

التضاعف للبلازميدات وخاصة التي لها علاقة بصفات أو خواص أو ملامح الهديبات pili.

يمكن تصنيف البلازميدات إلى مجاميع عدم توافق باستخدام الإختبارات التالية:

١ - نقل بلازميد B إلى خلايا مزرعة بكتيرية محتوية على بلازميد A ثم الإلتخاب لوجود البلازميد B من هذه الخلايا البكتيرية. يسمى البلازميد A في هذه الحالة بالبلازميد القاطن المستقر resident plasmid.

٢ - إختار ١٠ مستعمرات بكتيرية على الأقل ثم إختبرها بغرض التعرف على وجود البلازميد. أى إختبرها من حيث وجود البلازميد.

٣ - لو أن البلازميد A غائب من جميع المستعمرات. يتم عمل حالة تزاوج أى تقابل سلالتين mating وفيها يكون البلازميد A فى الخلية الواهبة والبلازميد B فى الخلية المستقبلة. لو أن دخول أحد البلازميدين يستبعد أو يمنع دائماً الآخر، فإن البلازميدين يكونان غير متوافقين.

٤ - لو أن البلازميد القاطن المستقر resident plasmid يظل متواجد فى مستعمرات النسل. فإنه يجب إختبار المستعمرات المحتوية خلاياها لكلا البلازميدين (أى الخلية الواحدة بها بلازميدين A، B) وذلك بإختبار حالة الثبات وإختبار حالة التكاثر المستقل لكل بلازميد عن الآخر.

يتم إختبار حالة الثبات لكل بلازميد وذلك بالتواجد المستمر لدلالات أو معلمات لكلا البلازميدين بعد عدة أجيال من نموها على بيئة غير إنتخابية monoselective media. التكاثر المستقل لكل من طرازي البلازميد يمكن التعرف عليه لو أن البلازميدين ينتقلان مستقلين عن بعضهما أثناء التزاوج.

لو أن البلازميدين A، B متواجدان باستمرار أى يوجد ثبات فى تواجدهما وعلاوة على ذلك أن كلا منهما ينتقل مستقل عن الآخر أثناء التزاوج فإن هذين

البلازميد متوافقين وبالتالي فإنهما يتبعان مجموعتين عدم توافق مختلفتين different incompatibility group. أتضح أن يمكن أن يوجد في الخلية الواحدة سبعة بلازميدات مختلفة متوافقة. يعتقد أن تحديد عددها يكون راجع إلى حجم المكان المتاح لزيادة من دنا، أي أن المكان داخل الخلية ضيق ولا يتسع إلا لسبعة بلازميدات متوافقة ولا يتسع لزيادة. مثال ذلك أن الخلايا المحتوية على سبعة بلازميدات مختلفة متوافقة يكون زيادة في كمية دنا تقدر بحوالى ٢٥%، وهذه الزيادة تكون ٢٥% علاوة على الكروموسوم.

كثير من البلازميدات يمكن نقلها بين بكتيريا القولون المختلفة enterobacteria ومثال ذلك إ. كولاى، *Shigella dysenteriae* وهذه البلازميدات يتم تصنيفها إلى ٢٥ مجموعة عدم توافق incompatibility groups. يمكن تصنيف البلازميدات أيضاً تبعاً لنوع الهدييات التى تكونها، يكون ذلك بوجود علاقات نسب بين أنواع الهدييات المختلفة يمكن إثباتها سيرولوجياً. توجد صفوف classes مختلفة للهدييات وهى F، شبه F (F-like)، I، وشبه I (I-like)، N وهكذا. فى حالة مجموعة Inc المثالية فإنها تحتوى على بلازميدات عديدة تشترك جميعها فى أن لها نظام تكاثر أى تكرار واحد وعلاوة على ذلك فإنها جميعها لها شكل عام للهدييات، وهكذا فإن صف الهدييات يستخدم بدرجة ما فى تسمية مجاميع Inc عدم توافق Inc groups. يوضح الجدول (جدول ١٩) ثمانية بكتيريات قولون فى مجاميع Inc مختلفة.

جدول ١٩: مجاميع عدم التوافق للبلازميدات Inc القابلة للنقل إلى إ. كولاى.

المجموعة	الهديب الجنسى	المجموعة	الهديب الجنسى
F <sub>I</sub>	F	I <sub>1</sub>	I
F <sub>II</sub>	F-like	I <sub>2</sub>	I-like
F <sub>III</sub>	F-like	N	N
F <sub>IV</sub>	F-like	P	RP <sub>4</sub>

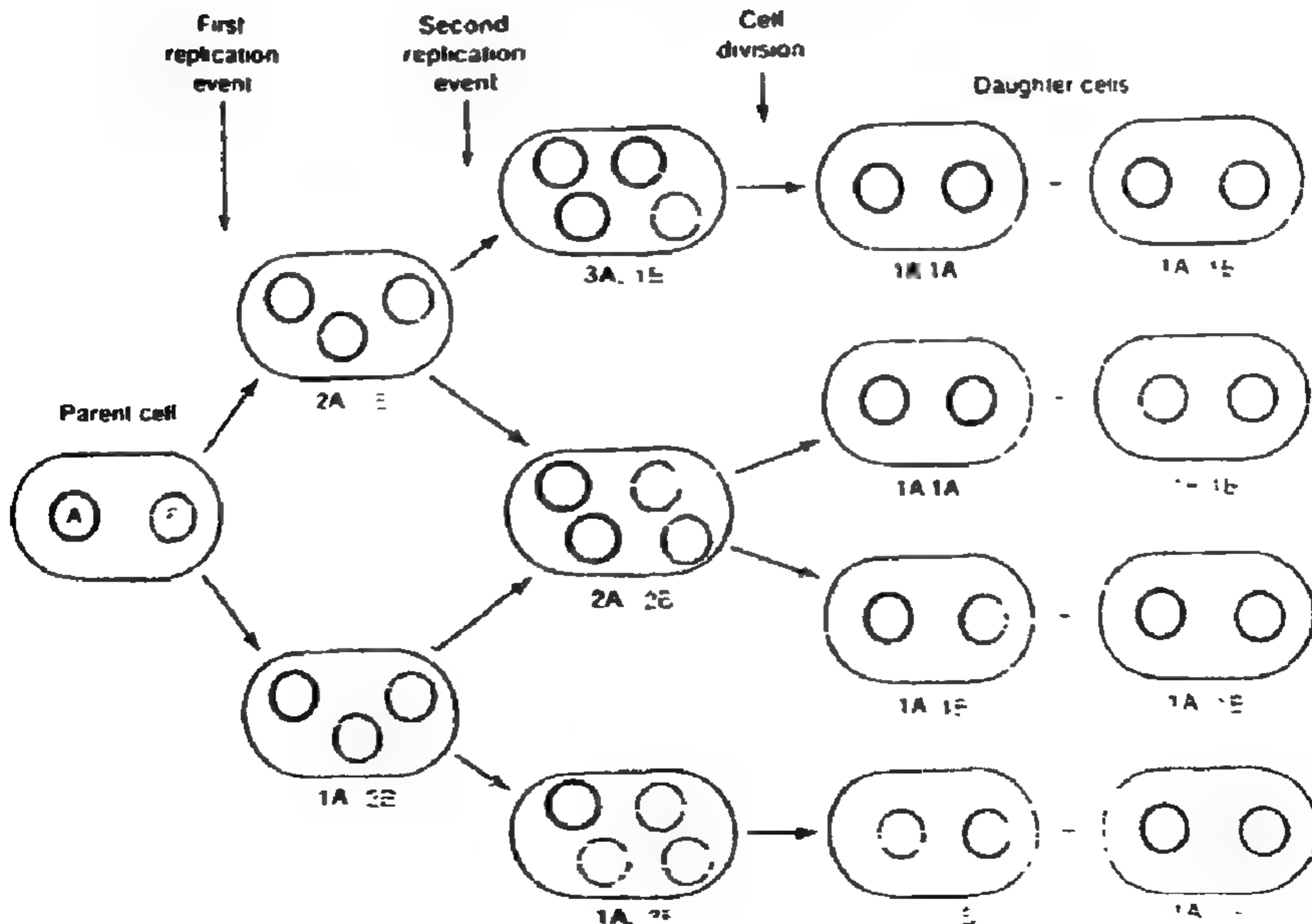


في الجدول بلازميدات F كلها في المجموعة  $F_1$ . بلازميدات R1، R100 في المجموعة  $F_{11}$ . بلازميدات Col أساساً في  $F_{11}$ ،  $I_1$ .

Some incompatibility groups of plasmids that are transmissible to *E. coli*.\*

Group	Sex pili	Group	Sex pili
$F_1$	F	$I_1$	I
$F_{11}$	F-like	$I_2$	1-like
$F_{111}$	F-like	N	N
$F_{IV}$	F-like	P	RP <sub>4</sub>

\* The F plasmids are all in group  $F_{11}$ ; R1 and R100, which are mentioned in the text, are in group  $F_{11}$ ; Col plasmids are mainly in  $F_{11}$ , and  $I_1$ .



شكل ١٢٢: تكوين أربعة أزواج من خلايا البكتيريا البنوية daughter cell من خلية واحدة بها بلازميدان متوافقين A، B. أنظر الشرح.

## تثبيط تكاثر أى تكرار أى تضاعف البلازميدات بواسطة الأكريدينات

### Replication Inhibition by Acridines:

كثير من المركبات التى يمكن أن تتداخل بين قواعد دنا وخاصة الأكريدينات acridines ومنها البروفلافين proflavin وبرتقالى الأكردين acridine orange وذلك فتحدث ظاهرة هامة وهى تثبيط تكاثر أى تكرار كثير من البلازميدات دون أن تؤثر على تضاعف دنا الكروموسوم البكتيرى. يمكن أن يسبب هذا التثبيط فقد البلازميدات وتسمى هذه الظاهرة شفاء الأكردين acridine curing. يمكن إكتشاف هذه الظاهرة بسهولة عندما تحتوى البلازميدات على جينات من العائل. ويمكن توضيحها كما فى الشكل (شكل ١٢٣). لو أن مزرعة بكتيرية لها تركيب  $F^{lac^+ / lac^-}$  تم تنميتها على بيئة تحتوى ببرتقالى الأكردين، فإن الخلايا تنمو وتنقسم. عدد خلايا  $lac^+$  فى عشيرة البكتيريا ثابت باستمرار وعدد خلايا  $lac^-$  يزداد. تفسير ذلك أنه عند وضع ببرتقالى الأكردين فى البيئة فإن أغلب الخلايا تحتوى على نسختين من  $F^{lac}$ . بعد جيل واحد فإن كل خلية تحتوى على نسخة واحدة من  $F^{lac}$  لأن تكاثر البلازميدات تم تثبيطه. ولذلك فى إنقسام الخلية التالى يوجد بلازميد واحد فقط لكل خليتين بنويتين ولذلك فإن نصف عدد الخلايا البنوية لن يحتوى على بلازميد. ولذلك فإن شفاء الأكردين يكون مفيد فى عزل سلالات من البكتيريا خالية من البلازميدات.

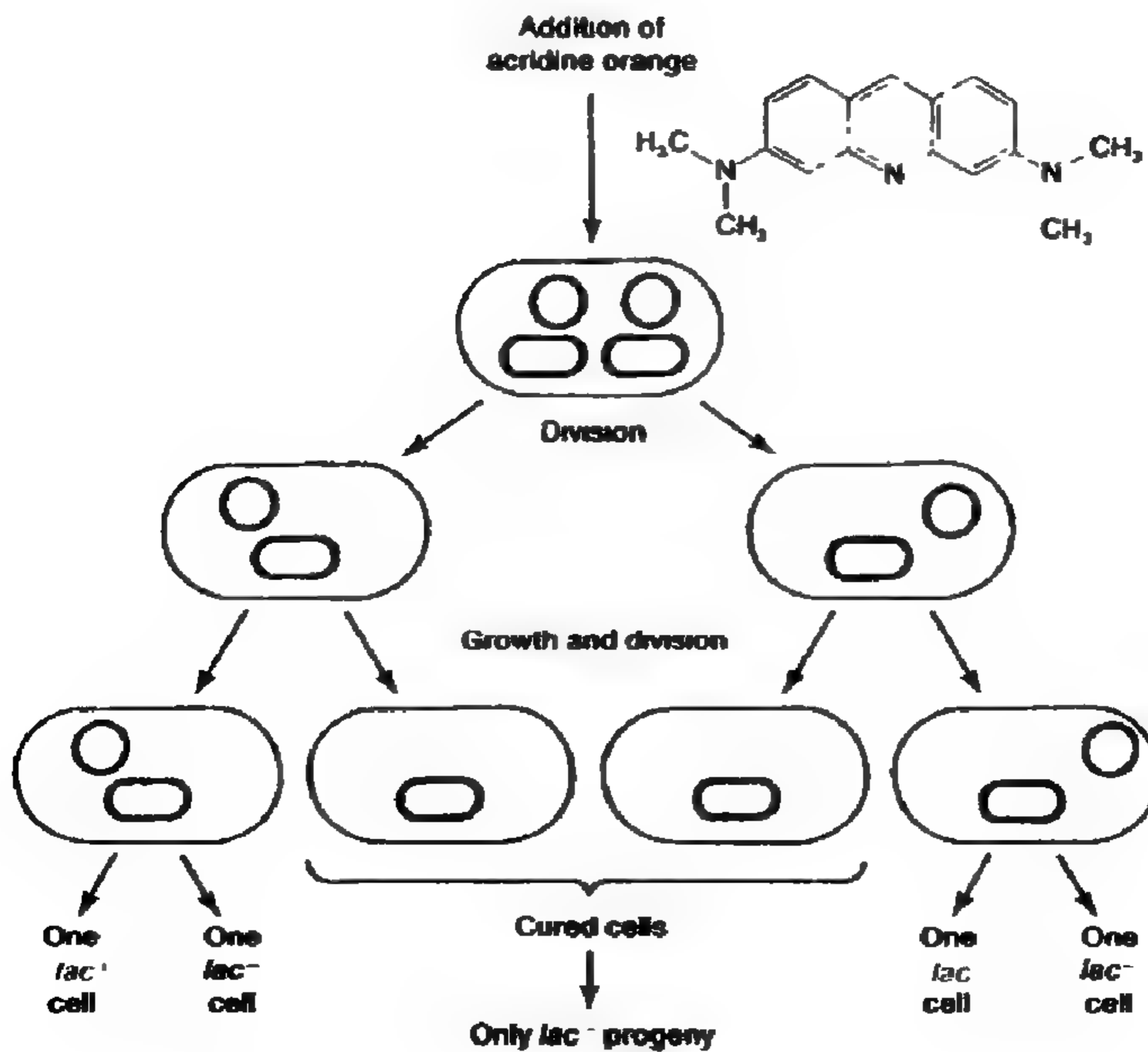
من عيوب آلية شفاء الأكردين أن هذه الآلية تعمل فى مدى ضيق جداً من تركيز الأكردين، وحيث أن الزيادة فى الأكردين. تسبب تثبيط تضاعف الكروموسوم والعكس صحيح فى حالة التركيزات القليلة حيث أنها لا تؤثر على تكاثر البلازميدات. وغير معروف السبب لماذا يتأثر تكاثر البلازميد ويصبح حساس للأكردين ولا يتأثر الكروموسوم بذلك. يعتمد شفاء الأكردين على pH البيئة بدرجة كبيرة فإن pH المثالى هو ٧,٦ أما pH ٧ و ٨ فهما يمنعان حدوث شفاء الأكردين. غير معروف أيضاً لماذا لا تتأثر بعض البلازميدات بالأكريدينات.

يمكن عمل الشفاء لسلاسل تحتوي بلازميدات مثل سلاسل عديدة من  $F^+$  بطرق أخرى غير الأكريدينات وهي تعرض الخلايا لدرجة حرارة  $45^\circ$  مئوية مع وجود تركيزات منخفضة من detergents أو تركيزات منخفضة جداً من مضادات حيوية بحيث أنها لا تؤثر على نمو الخلية ولكنها تسبب الشفاء أي عدم وجود بلازميدات في الخلية.

### تجزئة البلازميد عند انقسام الخلية

#### Partitioning of Plasmids at Cell Division

مجموعة من التجارب توضح أنه في حالة البلازميدات قليلة النسخ - low-copy-number plasmids فإن تجزئة البلازميدات وتوزيعها في خلايا البكتيريا البنوية أثناء انقسام الخلية يتم تنظيمه بكفاءة عالية. لو أن خلية على وشك الانقسام تحتوي نستختين من البلازميد كما هو الحال في البلازميدات  $F^-$ .



شكل ١٢٣: شفاء خلية محتوية على  $F^+ lac^+$  (يمثل بدائرة في الشكل) بنموها على بيئة تحتوي برتقالي الأكريدين.



فإن كل خلية بنوية تحتوى على نسخة واحدة. لو أن توزيع نسخى البلازميد يكون عشوائى فى الخلايا فإن كمية الخلايا التى ينقصها البلازميد فى العشيرة أى الخالية من البلازميد يكون تبعاً لتوزيع بواسون Poisson distribution هى ٣٧% من الخلايا. مثلاً فى حالة خلية  $F^+ lac^+ / lac^-$  فإن إنعزال الخلايا  $lac^-$  تحدث بنسبة حوالى ١ لكل ١٠ خلية لكل جيل، وعامة تكون هذه النسبة هى النسبة المثالية فى حالة فقد البلازميد من الخلية فى حالة البلازميدات قليلة النسخ أو العدد. من ذلك يتضح أنه توجد دلائل على وجود نظام وراثى محدد والذى ينظم عملية تجزىء وتوزيع البلازميد على الخليتين البنويتين وأن ذلك لا يحدث عشوائياً.

ومما يثبت الجملة السابقة أنه تم عزل طفرة فى البلازميد  $F$  والتى تزيد من إنعزال عدد الخلايا الخالية من البلازميدات بدرجة كبيرة وتصبح نسبة هذه الخلايا تماثل النسبة المتوقعة من التوزيع العشوائى للبلازميدات random partition. أمكن التعرف على نظامين متميزين two distinct systems فى الخلايا المحتية على بلازميدات قليلة العدد والتى تمنع إنعزال خلايا خالية من البلازميدات وأحد هذين النظامين يسمى par والنظام الثانى يسمى  $ccd$  أى إختصار control of cell division وهذا النظام يثبط إنقسام الخلايا المحتوية على نسخة واحدة فقط من البلازميد  $F$ .

أصبح من الواضح أن الخلايا ذات البلازميدات قليلة النسخ أو العدد لها نظام معين يتحكم ويمنع إنعزال عدد كبير من الخلايا من البلازميدات. هذا النظام المعين لا تحتاج إليه الخلايا ذات البلازميدات كثيرة النسخ أو العدد، ولذلك فإن توزيع البلازميدات فى هذه الحالة فى الخلايا البنوية يمكن أن يكون عشوائياً فى بعض الحالات. مثال ذلك أن إنعزال البلازميد ColE1 يحدث بنسبة حوالى  $10^{-6}$  إلى  $10^{-8}$  لكل جيل، وهى نسبة تماثل تماماً النسبة المتوقعة عند حدوث إنعزال عشوائى وتوزيع عشوائى للبلازميدات فى خلية تحتوى من ٢٠ إلى ٣٠ بلازميد.

ومما يثبت ذلك أيضاً أنه في حالة وجود سلالة من ColE1 بها بلازميدات قليلة وعددها ٢ أو ٣ لكل خلية وهذه السلالة موجودة فعلاً نتيجة طفرة وتسمى السلالة الطفرة الحساسة لدرجة الحرارة أثناء التكرار -ColE1 temperature-sensitive replication mutant فقد وجد أن إنعزال الخلايا الخالية من البلازميد يكون بنسبة ٠,٢ لكل جيل، وهذا يوضح أن هذه البلازميدات لا تمتلك النظام .par

### خواص بلازميدات بكتيرية خاصة

#### Properties of Particular Bacterial Plasmids

بعض البلازميدات الخاصة لها خواص فريدة ولذلك فإن لها إستعمالات هامة في وراثه البكتيريا وأيضاً في الهندسة الوراثية. قليل من هذه البلازميدات سيتم شرحه.

#### ١- البلازميدات F Plasmids:

صفة أو خاصية هامة للبلازميدات F وهي قدرتها على أن تلتحم وتكمل الكروموسوم البكتيري لينتج خلية Hfr. إلتحام وتكامل البلازميد مع الكروموسوم يكون تبادل عكسي reciprocal exchange ومشابه لما يحدث من إلتحام وتكامل الفاج لامدا  $\lambda$  مع الكروموسوم البكتيري. الفاج لامدا يكون lysogen مع البكتيريا. الإلتحام والتكامل في البلازميد F مع كروموسوم البكتيريا إ. كولاى يختلف عن الإلتحام والتكامل مع الفاج لامدا، حيث أنه يوجد مواقع تبادل exchange sites عديدة في البلازميد F وعديد من مواقع التبادل على الكروموسوم البكتيري ولذلك يمكن أن يحدث التكامل والإلتحام في مواقع عديدة. يوجد ٢٠ موقع رئيسى major sites على الكروموسوم وحوالى مائة موقع تحت رئيسى minor sites على الكروموسوم أيضاً معروفة ومحددة. مدى التجاذب بين F وهذه المواقع غير

متساو ويختلف باختلاف الموقع، فالبعض له جاذبية للبلازميد  $F$  أكثر من بعض المواقع الأخرى.

إنفصال أى قطع  $F$  excision عن الكروموسوم يمكن أن يحدث، ولو أن ذلك نادر تماماً (يحدث الانفصال، على أى حال، بتكرارية مرتفعة فى بعض المواقع عنه فى بعض مواقع أخرى). عادة تكون عملية القطع أى الانفصال غير كاملة imperfect excision، حيث يحدث قطع عند أحد الطرفين للبلازميد  $F$  المتكامل والقطع الثانى يكون فى دنا الكروموسوم القريب من الطرف الثانى للبلازميد المتكامل. فى هذه الحالة فإن البلازميدات  $F$  المنفصلة أى الجديدة تحتوى على جينات كروموسومية. هذا القطع الشاذ aberrant excision يكون هو أصل نشأ البلازميدات  $F'$ . توجد طرق وراثية تستخدم لعزل سلالات بكتيرية تحتوى على بلازميد  $F'$ .

تكامل  $F$  مع بعض الطفرات البكتيرية والتي فيها عيوب فى تضاعف أى تكرار دنا ينتج عنها ظاهرة تسمى الكبح التكاملى integrative suppression. يستخدم  $F$  بروتينات عديدة خاصة بتضاعف البكتيريا إ. كولاى ولكنها لا تحتاج ناتج الجين البكتيرى  $dna A$  و هذا الناتج يكون ضرورى لبدأ تضاعف دنا الكروموسوم.

وهكذا لو أن  $F$  توجد على هيئة بلازميد حر فى طفرة حساسة للحرارة temperetare sensitive من البكتيريا إ. كولاى  $dna A(Ts) E. coli$  Mutant  $dna A$  (Ts) وأرتفعت درجة الحرارة إلى ٤٢ درجة مئوية (هذه الدرجة من الحرارة توقف نشاط بروتين الطفرة  $dna A$  protein Dna A the mutant) فإن بداية تضاعف الكروموسوم لم تعد ممكنة ولكن بالرغم من ذلك فإن  $F$  يتضاعف أى يتكاثر ويظل محتفظ بهذه الصفة. العكس من ذلك يحدث عندما يلتحم  $F$  مع الكروموسوم فى السلالة الطفرة  $dna A(Ts)$  فإن الكروموسوم يمكنه أن يتضاعف



بإستمرار إلى مالا نهاية فى وجود درجة الحرارة المرتفعة السابق ذكرها. التضاعف أى التكرار لا يبدأ فى هذه الحالة عند أصل ومنشأ التكرار أى التضاعف للبكتيريا إ. كولاى ولكنه يبدأ عن الموقع *ori V* الخاص بتضاعف وتكرار *F*. وهكذا فإن تكامل *F* مع الكروموسوم يكبح الشكل الظاهرى للطفرة الحساسة للحرارة *dna A(Ts)* وذلك بتواجد منشأ للتضاعف أو التكرار مستقل عن ذلك الخاص بالتركيب *DnaA* أى غير معتمد على التركيب *DnaA*.

By providing a *DnaA* independent replication origin

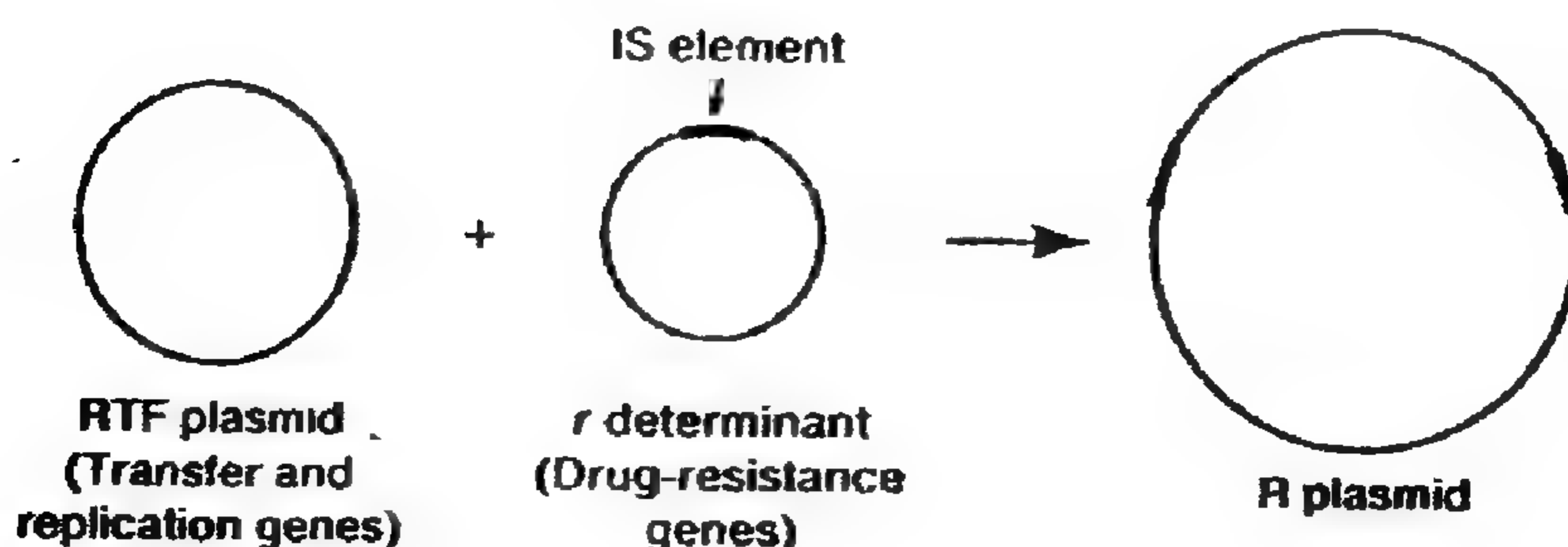
الإنتخاب فى أو من أعداد كبيرة screening من الخلايا لحالة الكبح التكاملى هو أحد الطرق لعزل سلالة بكتيرية فيها *F* فى حالة تكامل مع الكروموسوم. مثال ذلك أن السلالة البكتيرية *F<sup>+</sup> lac<sup>+</sup>/Str<sup>r</sup>* يمكن أن تتزاوج مع السلالة *lac<sup>-</sup> dnaA(Ts)* *Str<sup>r</sup>* ثم يتم إنتخاب خلايا بكتيرية *lac<sup>+</sup> Str<sup>r</sup>* وذلك بتنميتها على بيئة الحد الأدنى لاكتوز آجار المحتوية على ستربتوميسين فى درجة حرارة ٤٢ درجة مئوية. جميع المستعمرات الحية النامية لابد أن تحتوى على الجزء المكمل أو المتكامل *F<sup>+</sup> lac* كل واحد من هذه المستعمرت يكون *Hfr*.

## ٢ - البلازميدات المقاومة للعقاقير Drug-resistance plasmids:

البلازميدات الخاصة بمقاومة العقاقير والتي تسمى *R* تم عزلها من البكتيريا *S. dysenteriae* أثناء موجه مفاجئة عارمة من الدوسنطاريا فى اليابان وقد وجدت أيضاً فى البكتيريا إ. كولاى وبكتيريات أخرى كثيرة. البلازميدات *R* تكسب الخلية الحاوية لها مقاومة لعدد من المضادات الحيوية الفطرية والبكتيرية وعادة تكون قابلة للإنتقال ذاتياً. أغلب البلازميدات *R* تتكون من قطعتين أى جزئين من دنا معديتين *two contiguous segments* (شكل ١٢٤). أحد هاتين القطعتين تسمى النقل المقاوم *resistance transfer factor (RTF)* وهى تحمل جينات تنظم عملية تكاثر أى تضاعف دنا وأيضاً عدد النسخ وأيضاً نقل الجين *transfer genes*

وأحياناً تحمل جين مقاومة للتتراسيكلين (Tet). القطعة الأخرى أحياناً المحدد لـ R determinant R مختلفة في الحجم أى تختلف في أحجامها وتحمل جينات أخرى لمقاومة مضادات حيوية أخرى. تحمل البلازميدات R جينات مقاومة الأمبيسلين ampicillin (Amp) وكلورامفينكول chloramphenicol (Cam) وستربتوميسين streptomycin (Str) وكاناميسين kanamycin (Kan) وسلفون أميد sulfonamide (Sul) في مجموعة من التباديل والتوافيق.

توجد بلازميدات صغيرة مقاومة للعقاقير ولكن ينقصها القدرة على الانتقال ولكنها لا زالت تحتوى الجين Tet، وأحد هذه البلازميدات هو pSC101 والذي يستخدم بكثرة في الهندسة الوراثية. قطعتى أى جزيء بلازميد R تذكرنا بحالة البلازميدات F<sup>+</sup> ولكن يوجد إختلاف رئيسى بينهما وهو أن جينات المقاومة للمضادات الحيوية لا يتم إكتسابها بواسطة حدوث تكامل مع الجزء RTF ثم حدوث الانفصال الشاذ aberrant excision بنفس طريقة البلازميدات F<sup>+</sup> أى أنه لا يحدث تكامل لهذه الجينات مع الكروموسوم كما فى البلازميدات F<sup>+</sup> ولكنها يتم إكتسابها بواسطة المتنقلات transposons والتي تحمل جينات المقاومة للمضادات الحيوية. أى أن الإكتساب فى الحالة الأخيرة عن طريق المتنقلات.



شكل ١٢٤ : مكونات البلازميد R.

وهكذا يوجد فرق رئيسى بين كيفية إنتقال وتكامل البلازميدات  $F^+$  وكيفية إنتقال وتكامل البلازميدات  $R$ .

الأدلة على تكوين البلازميد  $R$  من جزئين أى قطعتين وهما الجزءين RTF والجزء الثانى المكون  $R$  أى  $R$  component، المحدد  $R$ -determinant  $R$  تم التعرف عليها بكل من التجارب الطبيعية والوراثية. فصل دنا المعزول من مزارع بكتيرية لبعض السلالات المحتوية على البلازميد  $R$ ، وضح حقيقة هامة وهى وجود ثلاثة أحجام من جزئيات دنا حلقيه. وجد أن طول الأكبر منها عبارة عن مجموع طول الأثنين الآخرين. أوضحت الدراسات الوراثية للبلازميدات  $R$  حاملة المعلومات أى الدلالات أى جينات مقاومة للكورامفينكول (Cam) والستروبوتوميسين (Str) والتتراسيكلين (Tet) والتي تنشأ من سلالات بكتيرية تحتوى على بلازميدات  $Tet^r$   $Cam^s$   $Str^s$  وسلالات أخرى تحتوى على سلالات  $Tet^s$   $Cam^r$   $Str^r$  أو سلالات حساسة لجميع المضادات الحيوية. المعلومات أو الدلالات  $Str^r$  و  $Cam^r$  لا تتجزأ إطلاقاً أى لا ينفصلان إطلاقاً حيث يوجدان معاً دائماً أو لا يوجدان معاً أيضاً دائماً. أكثر من ذلك مزارع  $Tet^r$   $Cam^s$   $Str^s$  يمكن أن تنقل المعلم  $Tet^r$  ولكن السلالات  $Tet^s$   $Cam^r$   $Str^r$  لا يمكنها نقل أى معلم من هذه المعلومات. ولكن السلالات  $Tet^r$   $Cam^r$   $Str^r$  يمكنها نقل جميع الثلاثة معلومات أو المعلم  $Tet^r$  فقط. أثبتت الدراسات الفيزيائية أن حجم متوسط للبلازميد الحلقى موجود فى الحالة  $Tet^r$   $Cam^s$   $Str^s$  فى الخلايا وحجم صغير للبلازميد الحلقى موجود فى الحالة  $Tet^s$   $Cam^r$   $Str^r$  فى الخلايا. يتضح من التجارب السابقة أن المعلم  $Tet^r$  يكون مستقر فى بلازميد ذاتى الإنتقال وهو RTF فى أحد الجانبين. وأنه فى بلازميد آخر غير قابل للإنتقال (الوحدة أو المكون Runit R) فإنه يحمل المعلومات أو الدالتين  $Str^r$  و  $Cam^r$ . وهكذا فإن البلازميد  $R$  الكبير يمكن أن يكون نتيجة لإلتحام البلازميد RTF والبلازميد المسمى المحدد أو الوحدة أو المكون Runit R أو R-determinant.



ملاحظة هامة وحساسة: وهى أن بعض السلالات وفى وجود بعض البلازميدات فإنه يتكون البلازميد الكبير R أى البلازميد المركب R (Composite R) وهو يتكون من إلتحام R مع RTF ويسمى RTF-R composite plasmid ولكن هذا البلازميد المركب يكون غير مستقر حيث ينفصل مرة أخرى مكوناً RTF وأيضاً الوحدة R. وهكذا فإن السلالات المحتوية على RTF والوحدات R يتكون منها عادة فى بعض الخلايا البلازميد الكبير أى المركب a composite plasmid. وهذه البلازميدات السابق ذكرها يمكن أن تتحد ويمكن أن تنفصل associate and dissociate، وعادة تكون فى حالة إتران. هذا الإتران بين الحالتين يعطى تكبير للجين فى حالة الخلايا الحاملة للبلازميد  $Tet^r$   $Cam^r$   $Str^r$ . هذه الخلايا الأخيرة على التركيزات المرتفعة جداً من Cam أو Str فإن هذه الخلايا تزداد مقاومتها لهذه التركيزات لأنها تكتسب نسخ عديدة multiple copies أو المحدد R ويكون نتيجة ذلك زيادة حجم البلازميد عن المعتاد. هذا التكبير فى البلازميد لا يحدث فى وجود تركيزات كبيرة من Tet. لا يسبب المضاد الحيوى تكبير البلازميد بطريقة مباشرة ولكن توضيح ذلك أنه فى المزرعة البكتيرية يوجد عدد نادر جداً من الخلايا يكون فيها عدد وحدات أو محددات R متضاعف duplicated، وهذه الأخيرة تعتبر طفرات ويحدث لها إنتخاب نتيجة لنموها المستمر على البيئة الزائدة التركيز من Cam أو Str وذلك نتيجة لسرعة نمو وتكاثر هذه الخلايا المحتوية على البلازميدات الطفرة بدرجة كبيرة جداً عن الخلايا الأخرى ولذلك تسود. هذه الحالة من تكبير الجين تكون غير ثابتة لأنه لو تم تنمية هذه الخلايا مرة أخرى على بيئة خالية من المضادات الحيوية ولذلك فإن الخلايا ستنمو بدون إنتخاب للمضاد الحيوى لعدة أجيال، فإن البلازميد سيعود لحجم الطبيعى مرة أخرى أى يحدث له إنفصال dissociation. الإلتحام والإنفصال association and dissociation للبلازميدات وتكبير الجين يحدث نتيجة للإلتحام بين القواعد المتتابة الشائعة فى دنا الخاص بـ RTF وأيضاً الخاص بـ R ومثال

ذلك الشظية IS (IS element). الإلتحام يكون نتيجة إعادة صياغة أى تزاوج recombination شظايا IS فى حلقات مختلفة من البلازميدات. والإنفصال يكون عملية عكسية لعملية التزاوج أى إعادة الصياغة بين شيطتين فى حلقة واحدة.

توجد مجموعة شيقة من البلازميدات R ومثال ذلك شبيه F للبلازميدات (F-like R plasmids) وهى تشمل البلازميدات R1، R6، R100. فى الخلايا المحتوية كل من F وأحد هذه البلازميدات فإن البلازميدات R تسبب تثبيت الخصوبة لـ F. باستخدام طريقة التحليل للمجموعات المكملة complementation analysis وضحت أن البلازميدات R شبيهة F تحتوى على أغلب الجينات *Ftra*.

الفحص بالمجهر الإلكتروني للتزاوج الغير متماثل الطول heteroduplexes المتكون بين البلازميد F والبلازميد R شبيه F وضح تماثل وتوافق شديد فى مواقع النقل transfer regions. التحليل التفصيلي لهذه heteroduplexes أثبتت أن البلازميد R شبيه F يتكون من قطعة كبيرة أى شظية كبيرة من البلازميد F مرتبطة مع محدد R مثالى. لوحظ أيضاً عديد من الانقلابات والنقص والإستبدال فى الجزيء F من البلازميد R. يوضح ذلك أن البلازميدين يحتمل أنهما يكونان قد نشئا من أصل واحد من أزمنة أو عصور أو أحقاب جيولوجية قديمة.

تعتبر البلازميدات ذات أهمية كبيرة فى الطب لأنها يمكن أن تنتقل بين البكتيريا التى تسبب أمراض وأوبئة هامة للإنسان، مثال ذلك البكتيريا *S. dysenteriae* والبكتيريا *S. typhimurium*. وأيضاً سلالات البكتيريا التى تسبب تلوث وإصابة فى المستشفيات مثل عديد من بكتيريا القولون مثل *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*. فى الحقيقة، أصبح من الواضح أنه منذ بداية عصر المضادات الحيوية فإن البلازميدات R إزدادت بدرجة كبيرة فى الطبيعة. مثال ذلك، أن البنسلين أستعمل فى بداية الأربعينات. فى سنة ١٩٤٦ فإن ١٤% من سلالات *S. aureus* المعزولة من المستشفيات كانت مقاومة للبنسلين. Pen<sup>r</sup> ثم أصبحت ٣٨% فى عام ١٩٤٧ ثم ٥٩% فى عام ١٩٦٩ ثم

تقريباً ١٠٠% فى السبعينيات. غالبية هذه السلالات المقاومة إما أن تحمل بلازميد R أو تحتوى جين  $Pen^r$  فى البلازميد R. إنتقال البكتيريا التى تحمل البلازميدات R شائع الحدوث أيضاً من حيوانات المزرعة إلى الإنسان. البلازميدات R شائعة الوجود وقوية فى حيوانات المزرعة نتيجة الإستعمال المكثف للبنسلين والتتراسيكلين فى غذاء الحيوان (إستخدام تركيز منخفض من المضادات الحيوية فى تغذية الحيوان والدواجن تؤدى إلى زيادة وسرعة فى نمو الحيوان ولذلك يكون مفيد إقتصادياً). مثال ذلك أن الدواجن تتلوث بكثرة بواسطة البكتيريا إ. كولاى والبكتيريا *S. typhimurium* والتى تسكن وتستوطن أمعاء الإنسان. إستخدام اللحم قبل الطهى يعتبر طريق عام للإنتقال للإنسان فإنه فى أثناء غسل الدواجن وتنظيفها وتقطيعها بأدوات المطبخ فإن البكتيريا تنتقل من اللحم إلى أدوات المطبخ وأسطح المطبخ وبالتالي تنتقل إلى الإنسان. وحيث أن البكتيريا مقاومة لعدد من المضادات الحيوية، فإن المضادات الحيوية المستعملة بكثرة فى حالة إصابات *S. typhimurium* أصبحت غير فعالة. تزداد الأمور سوء، حيث أن العلاج بالمضادات الحيوية ذات المدى الواسع تقتل بعض البكتيريا العادية فى العائل والتى قد تكون مفيدة وتسمح للبكتيريا الممرضة أن تزداد أكثر وبذلك تزداد وتشتد الإصابة. وفى هذا الصدد فإن كثير من أمراض الإنسان أصبحت شديدة الخطورة مرة أخرى ومثال ذلك مرض السل فى الإنسان وفى مقالة فى مجلة Time تناولت بالتفصيل هذا الموضوع من الناحية clinical وفيما يلى ملخص لهذه المقالة. أنه فى الولايات المتحدة الأمريكية تزداد الإصابة والموت بالسل عن ذى قبل إذ أتضح تكون سلالات من بكتيريا السل *Mycobacterium tuberculosis* تقاوم جميع المضادات الحيوية حتى الحديثة منها وفى هذا خطورة شديدة للمرض. كما أصبح تلوث المستشفيات بهذه البكتيريا محتمل فى بعض الحالات. وأن المرضى بعض منهم يشفى والبعض الآخر لا يشفى نتيجة وجود هذه السلالات المقاومة من البكتيريا ولذلك أصبح من المعروف أن المريض يستمر فى علاجه لمدة سنة وإذا لم يشفى فى



خلال هذه المدة أو في نهايتها فإن موته بمرض السل محتمل الحدوث بدرجة كبيرة.

### ٣ - البلازميدات السامة للبكتيريا Colicinogenic plasmids :

البلازميدات Col عبارة عن بلازميدات البكتيريا إ. كولاي قادرة على إنتاج كوليسينات colicins. الكوليسينات عبارة عن بروتينات تمنع نمو سلالات البكتيريا الخالية من البلازميد Col وهذه السلالات الأخيرة تكون حساسة للكوليسينات. توجد مجموعة من البلازميدات توجد في صف واحد من الصفوف الخاصة بالبلازميدات، وهذه البلازميدات في هذا الصف تسمى البلازميدات المنتجة للبكتريوسينات bacteriocinogenic bacteria. هذه البلازميدات تنتج البكتريوسينات في أنواع عديدة من البكتيريا وأيضاً في أجناس عديدة. البكتريوسينات عبارة عن مركبات كثيرة وأحد هذه المركبات الكوليسينات colicins، وهي مركبات بروتينية تتفاعل مع البكتيريا الحساسة وتسبب تثبيط واحد أو أكثر من العمليات الحيوية الضرورية مثل تضاعف أي تكاثر دنا وعمليات النسخ وعمليات الترجمة وعمليات التحول الغذائي للطاقة. توجد طرز أي أنواع من الكوليسينات كل منها يرمز له بحرف مثال ذلك كوليسين B وكل واحد من هذه الكوليسينات له طريقة خاصة أو آلية خاصة لتثبيط الخلايا الحساسة (جدول ٢٠).

جدول ٢٠ : خواص بعض الكوليسينات.

الكوليسين	التأثير
كوليسين b	ضرر للأغشية السيتوبلازمية
كوليسين B	ضرر للأغشية السيتوبلازمية
كوليسين E1	عدم إزدواجية الجهد الكيماوى الكهربائى خلال الغشاء
كوليسين K	عدم إزدواجية الجهد الكيماوى الكهربائى خلال الغشاء
كوليسين E2	تحليل دنا
كوليسين E3	يفصل أى يشق رنا الريبوسومى ١٦ S

أمكن التعرف على إنتاج الكوليسين بواسطة إختبار مماثل لذلك المستخدم فى التعرف على الفاج. توضع الخلية المنتجة للكوليسين على مسطح من خلايا بكتيرية حساسة على بيئة مناسبة، يثبط الكوليسين نمو البكتيريا القريبة منتجاً مساحة رائقة (منطقة رائقة) تعرف بإسم لاقونا lacuna (وهى تماثل plaques فى حالة الفاجات وتأثيرها على البكتيريا) تتكون فى الطبقة أى المساحة العكرة الناتجة من نمو البكتيريا الحساسة. يمكن أن يكون وجود بلازميد Col له قيمة أو فائدة لمعيشة العائل لأنها قد تكون قادرة على أن تنافس بكفاءة عالية الخلايا الحساسة للكوليسين الموجودة فى البيئة.

تقترح الدراسات على عديد من الكوليسينات النقية أنها نوعين وهى كوليسينات حقيقية true colicins وجزئيات فاج معيبة ناقصة defective phage particles. بعض الكوليسيمات عبارة عن بروتينات بسيطة. والنوع الآخر من الكوليسينات يشابه ذيل الفاج عند فحصها بالمجهر. الإلكترونى، مثل هذه الكوليسينات يمكن أن تكون نواتج الجين من بقايا بروفاجات قديمة remnants of incient prophages. كيف يكون ذلك؟ يعتقد أن بروفاج ناقص أو بروفاج معيوب a defective prophage وأنه فقد جينات خاصة بالتكاثر وأيضاً الجينات الخاصة بتكوين رأس الفاج ولكن هذا الفاج الناقص أو المعيوب لا زال يحتفظ ببعض الجينات والتى تشفر نظام مانع أى نظام كابح repressor system وأيضاً جينات تكون إنزيم محلل lysis enzyme وأيضاً تكون بروتينات الذيل. تشابه الكوليسينات الفاج فى أنها ترتبط بأماكن إستقبال خاصة specific receptor sites على جدار الخلية. دور بعض الجينات فى تخليق الكوليسينات يتم تثبيطه طبيعياً ولكن يمكن ظهوره بالمعاملة ببعض العوامل الضارة المخربة لدنا مثل الأشعة فوق البنفسجية.

فى كثير من الأحوال، تكون الكوليسينات غير فعالة ضد خلية تحتوى بلازميد Col ويكون قريب فى صلاته بالبكتيريا أى قاربة وراثية، تسمى هذه الحالة

بالمناعة immunity. في كثير من الأحوال، تحدث المناعة بواسطة بروتين صغير الحجم مفرز وهذا يرتبط ببروتين الكوليسين الكبير الحجم. يمكن أن يسمى البروتين صغير الحجم ببروتين المناعة immunity protein. يروتين المناعة لا يهب. فقط المناعة لخلايا Col<sup>+</sup> ولكنه أيضاً ضروري لقتل الخلايا الحساسة الخالية من Col أي Col<sup>-</sup>. مثال ذلك أن البروتين المسمى colicin cloacin DF 13 يتكون من ثلاثة مناطق (شكل ١٢٥)، منطقة إرتباط وأستقبال a receptor binding region ومنطقة خاصة بتخليق RNase ومنطقة خاصة للإلتحام ببروتين المناعة. القمة أو الطرف لمنطقة الإرتباط والأستقبال تكون كارهة للماء ومن المحتمل أن تتفاعل مع غشاء الخلية. قطعة أو منطقة الإرتباط الخاصة بالمناعة immunity-binding system لها شحنة سالبة شحنة قوية والتي تتعادل بواسطة بروتين المناعة الموجب الشحنة. بعد الإلتصاق بالمستقبل receptor فإن الكوليسين ينشق is cleaved وتبقى منطقة N الطرفية خارج الخلية والقطعة RNase تدخل الخلية تاركة بروتين المناعة على سطح الخلية. ينشط RNase ويحلل رنا الموجود في الريبوسومات وهكذا يقتل الخلايا الحساسة للكوليسين.



شكل ١٢٥ : مناطق عديد الببتيدات (بروتين) Cloacin DF13.

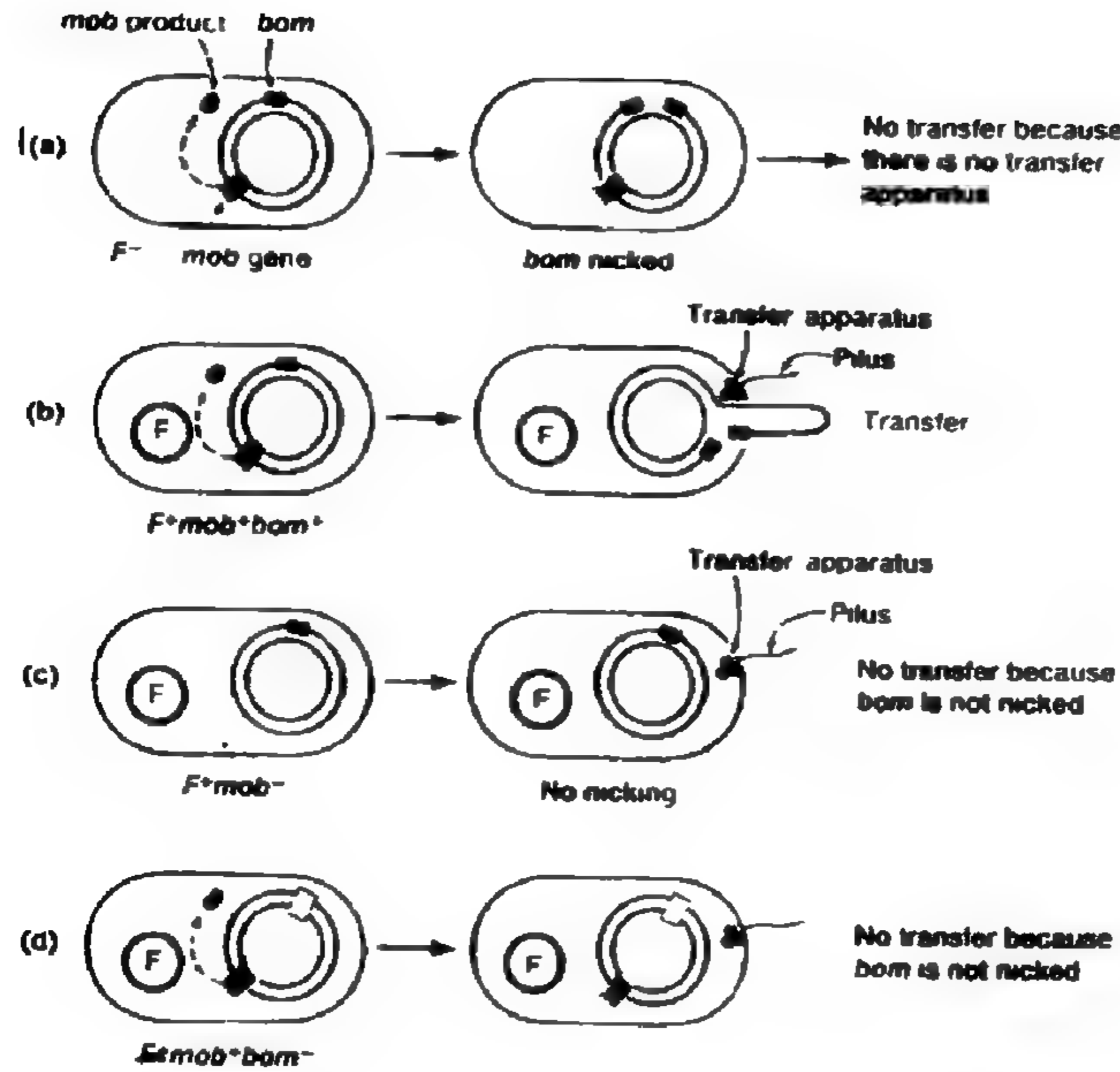
بلازميدات Col تختلف كثيراً في الحجم. هذه البلازميدات الصغيرة الحجم تكون غير قابلة للإنتقال ذاتياً والبلازميدات الكبيرة الحجم تكون قابلة للإنتقال ذاتياً self-transmissible. أفضل البلازميدات Col المدروسة هي Col E1 فهي تكون من تتابع للقواعد يتكون من ٦٦٤٦ زوج من القواعد المعروفة. يستخدم هذا البلازميد بكثرة في البحوث الخاصة بإعادة الصياغة لدنا recombinant DNA



research. كثير من البلازميدات Col الكبيرة الحجم القابلة للانتقال ذاتياً عبارة عن هجين بين بلازميد Col صغير وبلازميدات F أو F<sup>+</sup>.

يعتبر البلازميد ColE1 متحرك ذاتياً وكتله غير قابل للتزاوج nonconjugative plasmid، وقد تم إثبات أن الانتقال الذاتي يحتاج إلى جين أو جينات تشفر تخليق إنزيم نيوكلييز وقد وجد بالفعل أن الجين *mob* مسئول عن تخليق نيوكلييز. كما وجد أيضاً أن هذا البلازميد يحتوى على تتابع خاص من النيوكليوتيدات يسمى *bom* وهى إختصار الجملة basis of mobility وهذه المنطقة تحتوى على منطقة قطع cutting site. أمكن إثبات ذلك فى التجربة الآتية (شكل ١٢٦). توضح هذه التجربة أن يوجد بلازميدين متوافقين فى الخلية الواحدة وهما البلازميد F و ColE1. البلازميد F يمثل التزاوج ولكن البلازميد ColE1 ينقصه هذه الصفة ولكن البلازميد F يمكن أن يجعل ColE1 قابل للانتقال. فى حالة (a) يوضح خلية بها البلازميد ColE1 وخالية من F أى F<sup>-</sup>. الجين *mob* يتم تكوين ناتج نشاطه أى وظيفته تكوين ناتج يسمى ناتج *mob* (mob product). وجد أن المركب الناتج *mob* يسبب قطع فى موقع الجين *bom* (ويسمى الموقع الذى ينقطع فيه هذا الجين بإسم *nic*). ونتيجة لذلك فإن ColE1 زائد الحزنة من دنا يتحول إلى حلقة مقطوعة nicked circle. لا يحدث جركة وانتقال لأن ColE1 ينقصه القدرة على تخليق أو تكوين هديبات ولذلك لا يحدث تزاوج فى أزواج. فى حالة (b) تحتوى الخلية على كل من البلازميد F والبلازميد ColE1. يسبب F تكوين الهديبات وتكوين أى تخليق جهاز النقل transfer apparatus. ولذلك يحدث حركة وانتقال للبلازميد ColE1. طفرات فى الجين *mob* بحيث يصبح (*mob*<sup>-</sup>) فى ColE1 ويصبح البلازميد ColE1 غير قادر على الحركة. أوضحت الدراسات الوراثية أن الطفرة *mob* متحية كما أوضحت الدراسات أن الجين *mob* يكون بروتين قابل للانتشار. عند عزول هذا البلازميد المحتوى على الطفرة *mob* فإنه لا يكون فى حالة إسترخاء معقدة relaxation complex فشل F فى جعل ColE1 قابل للانتقال

توضحه الحالة C. في الحالة (c) فإن الهدييات تتكون وجهاز النقل يتكون أيضاً ولكن لا يحدث قطع في ColE1. وجدت طفرة أخرى في ColE1 والتي لها الشكل الظاهري  $Mob^-$  ( $Mob^-$  phenotype) ولكنها تمتلك الطفرة  $cis-inant$ ، وهذه الطفرة الأخيرة تسبب نقص في دنا ينتج عنه إزالة موقع الجين  $bom$  كلية وتماماً. يتكون بروتين  $Mob$  ولكن يفشل حدوث قطع في دنا ولذلك لا يحدث إنتقال للبلازميد ColE1 كما في (d).



شكل ١٢٦: إنتقال البلازميد ColE1 بواسطة البلازميد F (a) لا يحدث إنتقال لعدم وجود جهاز الحركة (b) يحدث إنتقال لوجود جهاز الحركة والهدييات وقطع في  $bom$  (c) لا يحدث إنتقال لعدم قطع  $bom$  بواسطة ناتج  $mob$  لأنه غير موجود لأن  $mob^-$  (d) لا يحدث إنتقال لعدم وجود قطع في  $bom$  لعدم وجودها  $bom^-$ .

### ٣- بلازميد Ti للبكتيريا *Agrobacterium*

مرض التدرن التاجي الموجود في كثير من النباتات ذوات الفلقتين يتسبب عن البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*. القدرة على تكوين التدرنات موجودة في بلازميد يسمى Ti عند إصابة النبات، فإن بعض من البكتيريا تخترق النبات وتنمو

فى داخل الخلايا النبات وتتخلل فى الخلايا محررة دنا فى خلايا النبات. من هذه النقطة أى عند هذه المرحلة لا تصبح البكتيريا ضرورية لتكوين الورم. جزء صغير من البلازميد Ti يسمى T-DNA أى T دنا يحتوى على جينات التضاعف أى التكرار، تصبح متداخلة وملتحمة ومكملة لكروموسومات خلية النبات. هذا الجزء من البلازميد المكمل للكروموسوم يحور من عملية تنظيم الهرمونات وتخليقها فى خلية النبات والتى تتحكم فى إنقسام الخلية، تسبب تحويل الخلية إلى خلية متدنة tumor cell أى تشارك فى تكوين الورم. هذا البلازميد أصبح هام فى تربية النبات لأن جينات معينة خاصة يمكن إدخالها فى البلازميد Ti بواسطة طرق دنا للإرتباط recombinant DNA techniques، وفى بعض الأحيان يمكن أن تصبح هذه الجينات جزء مكمل فى كروموسوم النبات، ولذلك فإنها تغير التركيب الوراثى والشكل الظاهرى فى النبات. أمكن إنتاج أصناف نباتات جديدة تحتوى على صفات مرغوبة ومفيدة إقتصادياً، تم الحصول عليها من أنواع بعيدة وغير قريبة من النبات المحور، وبذلك يمكن إنتاج أنواع من النبات بهذه الطريقة. وفيما يلى شرح تفصيلى لذلك.

تعتبر البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* من أهم الكائنات الحية المستخدمة فى دراسة الهرمونات النباتية حيث أمكن إثبات وجود مناطق معينة على المادة النووية تتحكم فى إنتاج بعض الهرمونات النباتية.

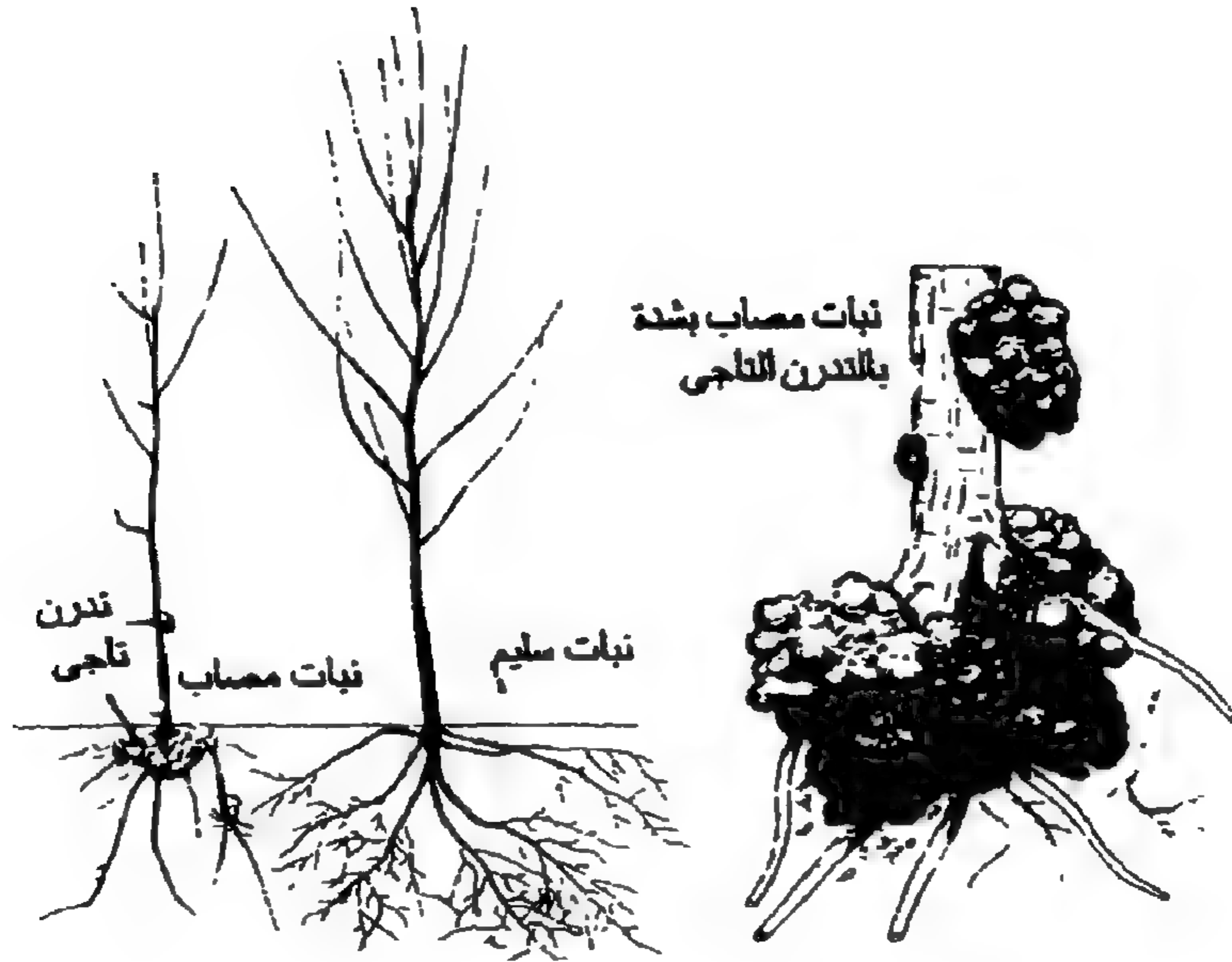
### **نبذة عن البكتيريا**

#### ***Agrobacterium tumefaciens***

تسبب هذه البكتيريا مرض هام فى النبات وهو التدرن التاجى crown gall. ينتشر هذا المرض فى جميع أنحاء العالم. تصيب البكتيريا عوائل خشبية وعشبية كثيرة تشمل مائة وأربعون جنس تتبع ستون عائلة. توجد على وجه الخصوص على التفاح والفاكهة ذات النواة الحجرية والعنب وعباد الشمس والورد.



يتميز المرض بتكوين تدرنات أى أورام ذات أشكال وأحجام مختلفة وتتكون عادة تحت سطح التربة مباشرة وهى الجزء من ساق النبات الذى يعرف بالتاج ومنه اشتق أسم المرض. يمكن أن تظهر أعراض المرض على الجذور الرئيسية. يقل محصول النبات المصاب وقد يموت. يشابه المرض سرطان الإنسان والحيوان ولذلك فإن كيفية حدوثه تمت دراستها بالتفصيل ولكن أيضاً توجد إختلافات جوهريّة فى الحالتين (شكل ١٢٧).



شكل ١٢٧: أعراض مرض التدرن التاجي.

حديثاً ونتيجة للدراسات المكثفة على هذه البكتيريا وهذا المرض. فقد أمكن إثبات أن البكتيريا فى تركيب أى محور المادة الوراثية لخلايا النبات العائل حيث أنه يوجد جزء من بلازميد هذه البكتيريا ويعرف هذا البلازميد بإسم Ti Plasmid DNA ويعرف هذا الجزء بإسم T-DNA ويمكن لهذا الجزء أن ينتقل ويلتحم فى DNA الخلية ويصبح جزء من المادة الوراثية للخلية ويمكن أن يعبر express عن وظيفته أو وظائفه بكفاءة عالية فى خلية النبات. ولذلك فإنه من الممكن

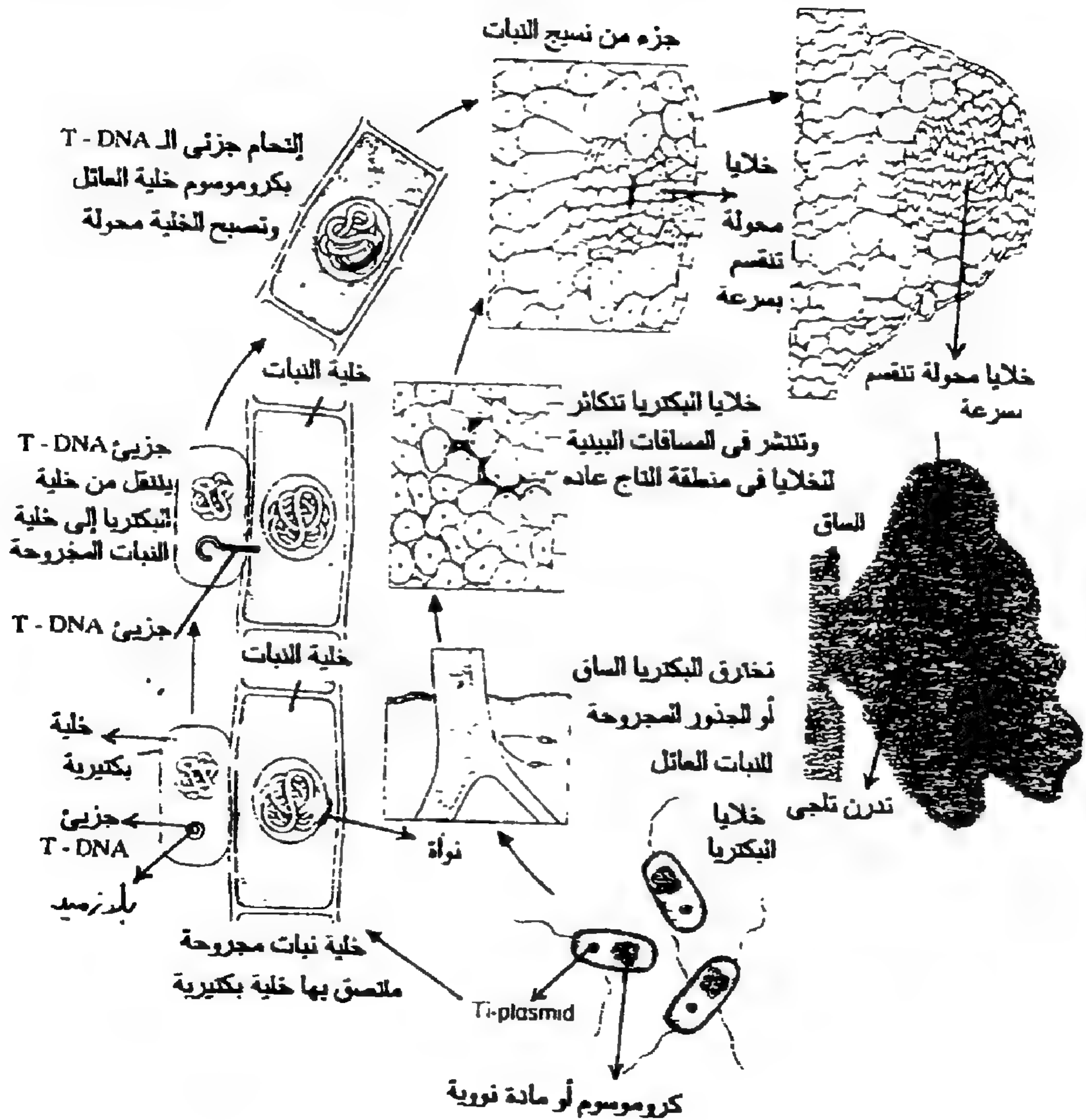
إستخلاص البلازميد بعد إدخال جينات جديدة إليه من نبات الفاصوليا. يتم إلتهام هذه الجينات أى أجزاء من DNA الفاصوليا مع البلازميد فى خلايا البكتيريا *A. tumefaciens*. ثم يتم عمل تلقيح بهذه البكتيريا فى نبات آخر مثل عباد الشمس وبذلك يمكن أن تنتقل جينات الفاصوليا إلى كروموسومات عباد الشمس وتصبح جزء من المادة الوراثية لنبات عباد الشمس.

تستعمل هذه الطريقة بكثرة فى نقل جينات من نبات إلى آخر عن طريق هذه البكتيريا ويعتبر DNA عباد الشمس المحتوى على جينات من الفاصوليا أنه recombinant DNA حديثاً يمكن تلقيح بروتوبلاست النبات العائل مباشرة بواسطة بلازميدات عادية أو مهندسة وراثياً وذلك فى عدم وجود البكتيريا. يمكن الآن إزالة أجزاء من البلازميد المسئول عن تكوين الأورام فى النبات وتظل الأجزاء الأخرى من البلازميد فعالة وقادرة على إظهار تأثيرها ولذلك فإنه يحدث تأثير عاد لهذه البلازميدات إلا أن خلايا البكتيريا تكون غير قادرة على إنتاج أورام فى النبات. تعتبر هذه البكتيريا مهندس وراثية طبيعى natural genetic engineer قادر على تحويل المادة الوراثية للنبات العائل وذلك بإدخال جزء من المادة الوراثية لهذه البكتيريا إلى كروموسومات النبات العائل. والآن تستخدم هذه البكتيريا على نطاق واسع لنقل جميع أنواع الجينات بين نباتات مختلفة متقاربة ومتباعدة وراثياً related and unrelated plants وأيضاً بين كائنات حية متباعدة بين الحشرات أو الفيروسات والنبات أى أنه يمكن نقل صفة من حشرة معينة إلى النبات عن طريق هذه البكتيريا (شكل ١٢٨). حشرة ذبابة النار ونبات التبغ والإشعاع أى الفلورة.

#### **الأعراض المرضية لهذه البكتيريا على النبات:**

تظهر أورام صغيرة على الساق أو الجذور بالقرب من سطح التربة فى البداية، وفى الأطوار الأولى تكون الأورام تقريباً كروية الشكل بيضاء أو لحمية اللون وطرية. وحيث أنه لى تحدث الإصابة لابد من وجود جروح أى أن التدرن

أو الورم ينتج في منطقة الجرح فإنه في البداية لا يمكن تمييزه عن نسيج الكالس callus ولكن سرعة تكوين الورم تكون أكثر بكثير من سرعة تكوين الكالس. يكبر التدرن في الحجم ويصبح سطحه ملتو ومتعرج. في النهاية تصبح الأنسجة الخارجية للتدرن بنية سوداء أو سوداء نتيجة لموت وتحلل الأنسجة السطحية للورم.



شكل ١٢٨: دورة حياة البكتيريا المسببة لمرض التدرن التاجي.



أحياناً لا يوجد خط فاصل واضح بين نسيج الورم وأنسجة النبات حيث يظهر الورم نتيجة لإنتفاخ غير منتظم الشكل في الأنسجة ويحيط بالساق أو الجذر. عادة يكون الإنتفاخ خارجي وملصق للجذر أو الساق عن طريق عنق ضيق من الأنسجة. وأحياناً يكون الورم أسفنجي القوام ويمكن أن ينفصل بسهولة عن الساق أو الجذر أو يتحلل أو ينفصل إلى أجزاء تسقط أو تتحلل. أحياناً أخرى يصبح الورم خشبي ويصبح درني الشكل ويصل قطره إلى ٣٠ سم أو أكثر. بعض الأورام يمكن أن تتعفن جزئياً أو كلياً ويبدأ العفن من السطح ويتجه إلى داخل التدرن وذلك في الخريف أو الشتاء ويتكون مرة أخرى في نفس المكان في الموسم التالي في الربيع أو الصيف أي في موسم النمو. أحياناً تتعفن أجزاء من الورم أو التدرن وتتحلل وتتكون أورام أخرى على الأجزاء المتبقية من الورم.

تتكون الأورام على الجذور والسيقان عادة عند سطح التربة ولكنها قد تتكون على بعد قد يصل متر ونصف من منطقة التاج للنبات وذلك في بعض النباتات الزاحفة أو العشبية وقد تتكون على أفرع الأشجار أو بتلات الأزهار أو عروق الأوراق. عادة يكون ورم أو تدرن واحد فقط ولكن يمكن أن يزيد ويصبح عديد من الأورام متصلة على الجذر أو الساق أو كليهما على الفروع.

قد لا يؤثر المرض تأثير ضار واضح على النبات ولكن قد يسبب قصر النبات وقد ينتج أوراق صغيرة ذات لون أخضر باهت ويكون النبات قابل للتأثر بالظروف البيئية غير الملائمة والتي تؤثر على نموه وإنتاجيته مثل ضرر الشتاء .winter injury

#### صفات البكتيريا:

عصوية الشكل ذات عدد قليل من الأسواط محيط peritrichous يوجد بداخل خلايا البكتيريا للسلاسل الممرضة بلازميد أو أكثر. يتكون البلازميد من DNA ثنائي الشريط أو الخيط، حلقى الشكل ووزنه الجزيئي يتراوح بين مائة إلى مائة

وأربعون مليون دالتون. يحمل أحد هذه البلازميدات جينات خاصة بتكوين التدرن أى الأورام ويسمى Ti plasmid وهى إختصار لكلمتين وهما منتج الأورام tumor-inducing. خلو البكتيريا من البلازميد Ti يجعلها غير ممرضة للنبات. كما أن المعاملة الحرارية للخلايا البكتيرية المحتوية على بلازميد Ti تفقدها هذا البلازميد ويصبح غير فعال وتصبح البكتيريا غير ممرضة للنبات أى تفقد القدرة على إصابة النبات. يحمل البلازميد Ti الجينات التى تحدد نوع العوائل النباتية التى يمكن أن تصيبها الخلايا البكتيرية الحاملة لهذا البلازميد وأيضاً تحدد نوع الإصابة على النبات العائل حيث أنه توجد أنواع وحالات مختلفة من الإصابة سبق ذكرها وأهم خاصية لهذه السلالات من البكتيريا أنها قادرة على نقل جزء من DNA هذا البلازميد بسرعة وبكفاءة عالية إلى المادة الوراثية لخلايا النبات ولذلك تتحول خلايا النبات العادية إلى خلايا أورام ينتج عنها التدرن وذلك فى فترة وجيزة. عندما يكتمل تحول بعض خلايا النبات العادية إلى خلايا نشطة فى عمل الأورام فإن هذه الخلايا الأخيرة تنقسم وتتمو بطريقة غير طبيعية لتزيد أو تكون الأورام ويكون ذلك حتى فى عدم وجود البكتيريا حيث يصبح الانقسام غير مرتبط بالبكتيريا.

عند نقل جزء من هذه الأورام والذى يحتوى على خلايا نشطة فى الانقسام إلى بيئة مغذية وقد تكون بيئة سائلة أو بيئة آجار فإن هذه الخلايا تكون نشطة فى الانقسام فى عدم وجود هورمونات معينة تحتاجها الخلايا العادية على نفس هذه البيئة لى تصبح قادرة على الانقسام، أى أن الخلايا العادية تحتاج إلى وجود هورمونات معينة فى البيئة لى تنقسم ونت هذه الهورمونات إندول حامض الخليك ولكن خلايا التدرن لا تحتاج إلى هذه الهورمونات على نفس البيئة. تخلق خلايا النبات المكونة للورم أى المحتوية على جزء من DNA بلازميد Ti مركبات كيميائية خاصة تسمى opines والتى يمكن أن تستعمل فقط بواسطة البكتيريا المحتوية على بلازميد Ti مناسب بينما الخلايا العادية غير

قادرة على تخليق هذه المركبات وحتى أستعمالها. وهذه حالة طفيل وراثى genetic parasite حيث أن جزء من DNA بلازميد البكتيريا ينتقل إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل وبذلك ينبه ويشجع الخلايا على تكوين مركبات معينة لازمة للبكتيريا وغير لازمة لخلايا النبات العائل ولا يكونها أصلاً أى أن يحدث تغيير فى عمليات التحول الغذائى فى خلايا النبات لصالح البكتيريا وحيث تستفيد البكتيريا فى غذائها من هذه المركبات.

### **حدوث المرض:**

تعيش البكتيريا فى الشتاء فى التربة وحيث يمكنها أن تعيش كذلك لعدة سنوات ويكون نوع المعيشة رمية. عند نمو النبات العائل فى هذه التربة الملوثة بالبكتيريا فإنها تخترق الجذور أو السيقان بالقرب من سطح التربة ولا بد من وجود جروح حديثة نسبياً لى تحدث عملية الأختراق وبالتالي إصابة النبات. تتكون هذه الجروح نتيجة للعمليات الزراعية والتطعيم والحشرات إلخ. توجد البكتيريا فى بداية الإصابة فى المسافات البينية بين خلايا النبات وتنشط الخلايا المحيطة بها لى تنقسم. يتكون نتيجة لذلك حلقات من الخلايا التى لها قدرة فائقة على الانقسام بالمقارنة بالخلايا العادية وتظهر هذه الحلقات من الخلايا فى نسيج القشرة أو الكميوم تبعاً لدرجة عمق الجروح. تحتوى هذه الخلايا على نواة أو أكثر. تنقسم هذه الخلايا بسرعة فائقة تسمى هذه الحالة hyperplasia وتكون خلايا غير متشكلة وغير متميزة فى تركيبها التشريحي وبعد حوالى عشرة أيام إلى أسبوعين بعد التلقيح يظهر الورم ويمكن رؤيته بالعين المجردة. أمكن للمؤلف عدوى نباتات صغيرة من عباد الشمس وبدء ظهور الورم بعد أربعة أيام. حيث أن الأنقسام السريع العشوائى للخلايا وأيضاً كبر حجم الخلايا بطريقة غير منتظمة فإن التدرن أو الورم يزداد فى الحجم تدريجياً ويكون تدرن صغير. عادة تكون البكتيريا غير موجودة فى مركز التدرن أى أن هذا الجزء من الأنسجة خال من خلايا البكتيريا إلا أن الطبقة أو الجزء السطحى من التدرن يحتوى على خلايا



بكتيرية فى المسافات البينية للخلايا. فى هذه المرحلة تتميز بعض خلايا التدرن إلى أوعية خشبية وقصيبات ولكنها تكون غير متصلة بنسيج الخشب للنبات أو يكون إتصالها فى مناطق قليلة محددة بنسيج الخشب للنبات. عند كبر الورم فى الحجم فإنه يضغط على الأنسجة المحيطة به وأيضاً الأنسجة أسفله والتي تسبب سحق وتمزق لهذه الأنسجة فى النبات العائل. قد يحدث سحق لأوعية الخشب بواسطة التدرن وقد يسبب ذلك ضعف إنسياب الماء إلى أعلى فى الأوعية الخشبية وبذلك يقل إنسياب الماء إلى المجموع الخضرى قد يصل ذلك إلى ٢٠% فقط من الماء المناسب إلى المجموع الخضرى فى الحالة العادية.

لا تغطى التدرنات الملساء الصغيرة بنسيج البشرة ولذلك فإنها تهاجم بالحشرات أو الكائنات الحية الدقيقة الرمية. هذه الكائنات الأخيرة تسبب تلون الجزء السطحى من الورم باللون البنى أو الأسود كما قد تسبب تحلله. تحلل أو تمزق الجزء السطحى من الورم يسبب تحرر البكتيريا وسقوطها فى التربة والتي قد تحمل بمياه الري أو الأمطار لتصيب نباتات جديدة.

عند كبر الأورام تصبح أحياناً خشبية وصلبة. تكوين الحزم الوعائية الغير كامل والغير مرتب فى الورم يكون غير فعال فى تأدية وظيفته ونتيجة لذلك فى بعض الحالات تكون الأورام غير قادرة على الحصول على الماء أو التغذية بدرجة كافية ولذلك يتوقف كبر التدرن فى الحجم ويحدث تجلل لبعض أجزائه ويحدث موت لبعض الأجزاء ثم تتحلل وتتلاشى هذه الأجزاء الميتة. فى بعض الحالات يضرر التدرن ولا يظهر تدرن جديد ولكن عادة يتبقى جزء حى من التدرن ويتكون منه أوام أخرى فى نفس الموسم أو فى الموسم التالى.

عند إصابة الأنسجة الغير بالغة والصغيرة السن وأيضاً الأنسجة التى لها درجة كبيرة من الاستطالة فإنه يتكون فى منطقة الإصابة ورم ابتدائى primary tumor وقد يتكون أسفل هذا الورم ولكن عادة يتكون أعلاه ورم آخر يسمى بالورم الثانوى أو التدرن الثانوى secondary tumor ويمكن أن يبعد هذا الورم

أو التدرن الثانوى عن الورم الابتدائى لمسافة صغيرة أو متوسطة أو كبيرة حيث يمكن أن يظهر الورم أو التدرن الثانوى على فرع النبات. أحيانا تظهر الأورام الثانوية على ندب الأوراق المتساقطة أو فى مكان الجروح الناتجة عن عوامل مختلفة أو حتى على أجزاء من الساق غير مجروحة ظاهرياً أو على أعناق الأوراق وعلى العروق الوسطية أو العروق الكبيرة للأوراق. تبعد هذه الأوراق المصابة عن الورم أو التدرن الابتدائى عدة سلاميات. بداية تكوين التدرن الثانوى تكون من نسيج خشب الحزم الوعائية. وهذه الأورام أو التدرنات الثانوية تكون دائماً خالية من البكتيريا المسببة للمرض. حيث أنه عند قطع هذه الأورام وتعقيمها ووضعها على بيئة مناسبة فإنه لم يمكن عزل هذه البكتيريا وذلك دليل على أن هذه الأورام الثانوية خالية من البكتيريا. عند أخذ جزء من الورم أو التدرن الثانوى وتطعيمه على نبات سليم فإنه يسبب تكون أورام على النبات السليم وتكون هذه الأورام خالية من البكتيريا أيضاً ولكنها تشبه الأورام الابتدائية فى شكلها ومظهرها وتركيبها.

يثبت ذلك من أن البكتيريا لها أهمية كبيرة فى بداية المرض فقط حيث أنها تسبب تأثير مهيج للخلايا والأنسجة irritant effect فى النبات المصاب. وبعد حدوث الإضطراب والهيّاج فى الخلايا فإنها لا تحتاج إلى البكتيريا لحدوث انقسام الخلايا الغير منتظم والمسبب لتكوين التدرن حيث أن هذه الخلايا تصبح قادرة ذاتياً على إنتاج العامل المؤثر والذي يحدث هياج للخلايا لتصبح قادرة على الانقسام بسرعة فائقة وبطريقة غير منتظمة وأيضاً بطريقة غير متحكم فيها uncontrolled ولذلك فإن البكتيريا لها أهميتها فقط فى بداية حدوث الورم ولكن بعد ذلك يمكن للخلايا المكونة للورم أن تسبب هياج خلايا أخرى وأنقسامها إنقسام زائد فى عدم وجود البكتيريا. بالرغم من وجود دراسات مكثفة لمعرفة طبيعة المسبب لهياج irritant خلايا النبات وميكانيكية تحول الخلايا العادية إلى خلايا أورام فإن المعلومات فى هذين الموضوعين لازالت غير متكاملة وغير

حاسمة. عامة فإن كمية كبيرة من هذه المعلومات قد عرفت خلال العشر سنوات الماضية وهى أن خلايا البكتيريا لسلالات الممرضة للنبات تحمل بلازميد من نوع معين يسمى بلازميد Ti وأن عدم وجود هذا البلازميد يفقد البكتيريا قدرتها على إصابة النبات ولا بد أن تكون الإصابة بالقرب من جرح حديث. تدخل هذه البكتيريا جزء من البلازميد يسمى T-DNA فى المادة الوراثية لخلايا النبات المصابة بالقرب من الجروح وحيث تصبح خلايا النبات فى هذه المنطقة قابلة لأستقبال هذا الجزء أى T-DNA أى أن خلايا النبات تأخذ أعداد من T-DNA فى هذه المنطقة. ولذلك فإن خلايا النبات فى هذه المنطقة تتحول لى تصبح قابلة لأستقبال T-DNA وأما عن كيفية هذا التحور وكيفية حدوثه فهو غير معروف. تصبح أجزاء T-DNA ملتحمة بكموسومات خلايا النبات فى أماكن عديدة. تصبح هذه الخلايا النباتية قادرة على أظهار الصفات الموجودة فى T-DNA وتسمى هذه الخلايا بأنها محولة. هذه الخلايا المحولة transformed تنتج opines والتي تستخدم وتستعمل فقط بواسطة خلايا البكتيريا التى تحتوى على بلازميد المحتوى على جزء T-DNA. يزداد تركيز مركبات أخرى فى هذه الخلايا النباتية المحولة ومنها الهرمونات النباتية مثل أندول حامض الخليك وأيضاً بعض السيتوكينينات cytokinins وبعض الإنزيمات.

حتى الآن غير معروف كيف يتم زيادة تركيز الهرمونات والإنزيمات وكيفية تخليق opines وما هى علاقتها بالخلايا المحولة وهل يوجد علاقة بين هذه التغيرات وبعضها أولاً توجد بالمرّة وما هو علاقة ذلك بجزء T-DNA وما هو علاقة ذلك كله بأنقسام وكبر الخلايا المحولة فى النبات والتي ينتج عنها نمو غير محكوم uncontrollable لتكوين الأورام.

### **مقاومة المرض:**

تبدأ مقاومة المرض بالمرور والتفتيش على الأشجار والشجيرات فى المشاتل



nursery ورفض المصاب منها وإستبعاده وإبادته. فيمنع زراعة الأشجار والشجيرات القابلة للإصابة فى حقول ذات تربة ملوثة بالبكتيريا المسببة للمرض. تزرع الذرة الشامية أو أحد محاصيل الحبوب الأخرى لعدة سنوات متتالية فى الحقول ذات التربة الملوثة بالبكتيريا وقبل زراعتها بالشتلات أو الشجيرات القابلة للإصابة. حيث أن البكتيريا تخترق النبات عن طريق الجروح الحديثة فيجب الحذر التام والعناية فى عدم تجريح جذور أو ساق النيات أثناء الزراعة. يجب أيضاً مقاومة الحشرات القارضة للجذور مقاومة تامة فى المشاتل لتقليل حدوث الإصابة كلما أمكن ذلك. يجب إستعمال التطعيم بالبراعم budding وعدم إستعمال التطعيم بالقلم أى بعده براعم حيث أن درجة إنتشار مرض التدرن التاجى فى الحالة الأولى أقل بكثير من درجة إنتشاره فى حالة التطعيم بالقلم أى بعده براعم grafting.

يحب شراء وزراعة نباتات خالية من الإصابة. يمكن مقاومة المرض وذلك بكشط التدرن مع مساحة حوله وأسفله ويتم دهان هذا الجزء بواسطة محلول elgetol-methanol ويكون ذلك بواسطة الفرشة. يتكون هذا المحلول من جزء واحد sodium dinitrocresol إلى أربعة أجزاء wood alcohol. يمكن دهان المكان بعجينة بوردو.

يمكن مقاومة المرض بدهان مكان الورم بمخلوط من مركبات هيدروكربونية عطرية aromatic hydrocarbons يباع تجارياً ويكون هذا المخلوط إختيارى التأثير أى أنه يقتل خلايا وأنسجة التدرن دون أن يقتل الخلايا والأنسجة العادية المجاورة ولكن لا يستعمل ذلك عملياً على نطاق واسع.

يمكن عمل مقاومة حيوية لهذا المرض وذلك بنقع البذور أثناء الإنبات أو غمر بادرات المشتل أو الأصول المستعملة كجذور فى معلق من سلالة خاصة من سلالات البكتيريا *Agrobacterium radiobacter* وهى رقم ٨٤ (strain No 84) تضاد هذه السلالة من البكتيريا كثير من سلالات البكتيريا المسببة لمرض التدرن

التاجي وبذلك تقى النبات من الإصابة. يمكن معاملة البذور الغير نابتة بهذه السلالة كما يمكن أيضاً رش وغمر التربة في مكان النبات بمعلق من خلايا البكتيريا لهذه السلالة. يعتقد أن هذه السلالة ٨٤ من البكتيريا توجد على سطح العائل وتفرز مركز bacteriocin agrocine. يعتبر هذا المركب مثبط لكثير من السلالات الممرضة للبكتيريا المسببة لمرض التدرن. وبذلك تقى النبات من الإصابة ومن حدوث التدرن، ولكن لسوء الحظ بعض سلالات بكتيريا التدرن التاجي الممرضة يمكنها أن تقاوم مركب agrocine 84 ولذلك فإن هذه السلالة البكتيرية فقدت قدرتها على مقاومة المرض في بعض المناطق.

### المتحركات المستعملة في عزل ونقل الجينات

#### Cloning Vehicles Used For Cloning In Plants:

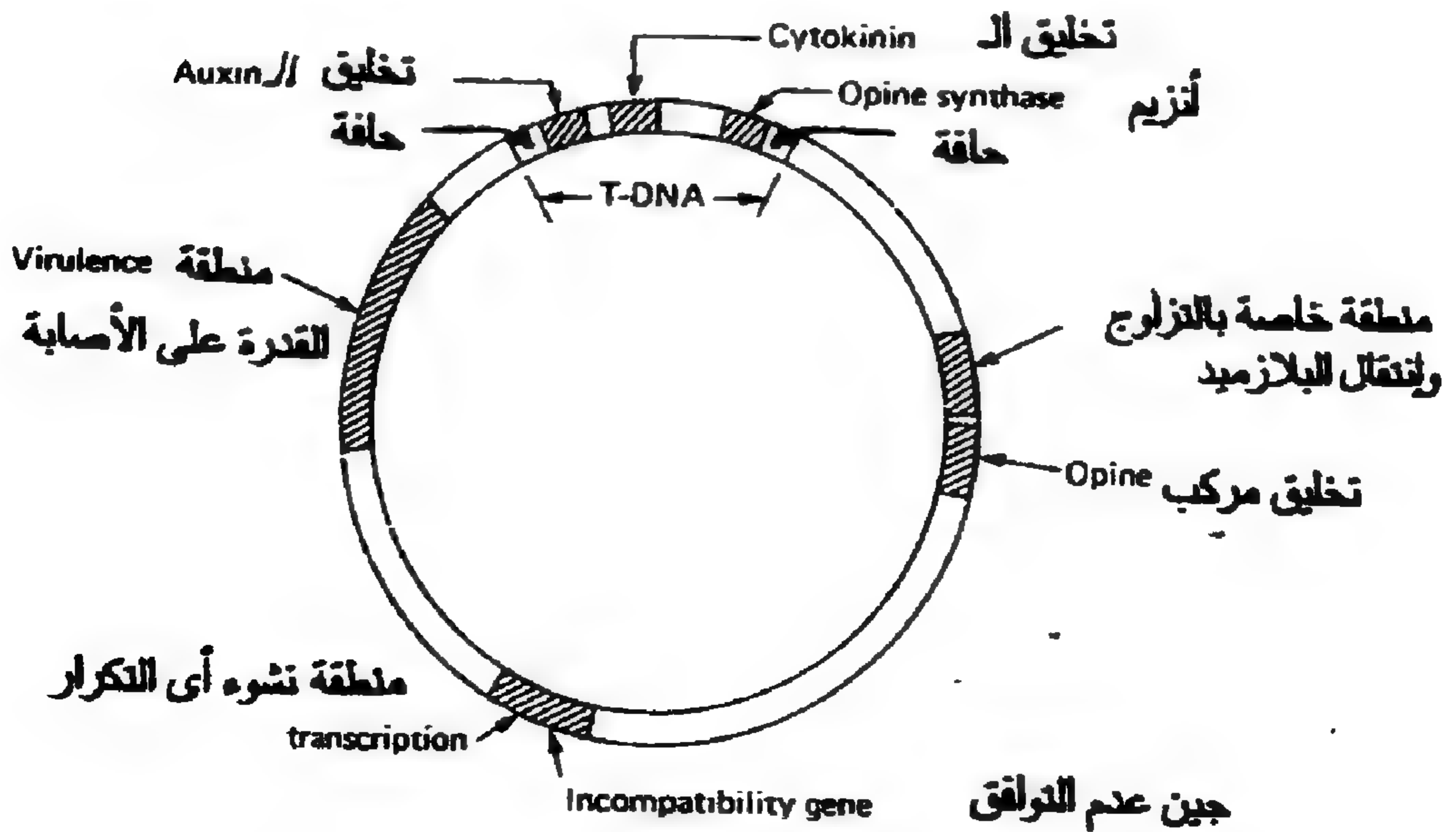
تعتبر vectors أو cloning vehicles كائنات حية دقيقة عادة أو أجزاء منها agent والتي تنقل المادة الوراثية من كائن حي يسمى الواهب donor إلى كائن حي آخر يسمى المستقبل recipient وبحيث أن هذه المادة الوراثية المنقولة يمكن أن تعبر عن نفسها وذلك بأظهار الصفة أو الصفات الخاصة بها في الكائن المستقبل أو في الخلية المستقبلة recipient cell ومثال ذلك البلازميدات والفيروسات البكتيرية أي البكتيريوفاج bacteriophage والتي تسمى أيضاً للأختصار بالفاج phage وذلك في حالة البكتيريا وأيضاً الفيروس SV40 لخلايا الحيوان. تعتبر الكوزميدز cosmids أيضاً كذلك وهي عبارة عن نوع خاص من البلازميدات المهندسة وراثياً مشتقة من نوع خاص من الفاج وهو الفاج لامدا bacteriophage lambda وهذه البلازميدات والفاج و SV40، و cosmids تستعمل لأنها cloning vehicles أو vectors للمادة الوراثية المنقولة إلى البكتيريا والخميرة والحيوانات. يستعمل البلازميد الخاص بالبكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* وأيضاً فيروس موزايك أي تبرقش القنب وهو عبارة عن DNA ثنائي الشريط DNA double stranded أي ds DNA في نقل المادة الوراثية إلى

النبات. بالإضافة إلى ذلك فإنه توجد فيروسات وحيدة الخيط أو الشريط ss-DNA وتسمى geminiviruses وأيضاً فيروسات RNA وحيدة الشريط أو الخيط single stranded RNA(ss-RNA) وهي فيروس موزايك أى تبرقش التبغ tobacco mosaic virus (TMV) وبعض الفيروسات الأخرى وأيضاً المتقلات transposons تستعمل فى نقل المادة الوراثية فى النبات. وفيما يلى شرح لأهم cloning vehicle فى نقل المادة الوراثية فى النبات وهو البلازميد Ti.

بلازميد Ti للبكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*: يستعمل هذا البلازميد بكثرة فى نقل صفات إلى خلايا النبات كما سبق ذكره فى الجزء السابق. يحتوى هذا البلازميد على عدد من الجينات وقد تم التعرف على بعضها وتحديد وظائفها. يحتوى الجزء من هذا البلازميد المسمى T-DNA على عدد من الجينات منها. الجين الأول والذي يخلق إنزيم opine synthetase والذي يقوم بتخليق opines وهي مركبات تنتج فقط بواسطة خلايا النبات العائل المحولة transformed بواسطة هذه البكتيريا. هذه المركبات وهي opines يمكن أن تستخدم كمصدر للكربون والأزوت بواسطة خلايا البكتيريا التى تحتوى على بلازميد Ti. خلايا البكتيريا الخالية من بلازميد Ti غير قادرة على استعمال opines فى التغذية كمصدر للكربون والأزوت. كما أن خلايا البكتيريا يجب أن تحتوى على جين خاص بتخليق opines. الجين الثانى أو مجموعة أخرى من الجينات تتحكم فى تخليق السيتوكينينات. حيث أن تنشيط تكوين السيتوكينينات فى النبات ينتج عنه تكوين أورام الجذور. الجين الثالث أو مجموعة من الجينات والتى تتحكم فى تخليق الأوكسينات. حيث أن تنشيط تكوين إندول حامض الخليك فى النبات ينتج عنه تكوين أورام الساق. الجين الرابع أو مجموعة من الجينات وهي عبارة عن حافتي الجزء T-DNA من الناحية اليمنى والناحية اليسرى وتتكون كل من الحافة اليمنى والحافة اليسرى من ٢٥ زوج من القواعد النووية وهي التى تتحكم فى عملية نقل جزء T-DNA من البلازميد إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل حيث وجد أن إزالة ٢٥ زوج من القواعد النووية أى الحافة



اليمنى لجزئى T-DNA من البلازميد منع إنتقال هذا الجزء إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل وأيضاً تؤثر على قدرة البكتيريا على الإصابة وتصبح غير فعالة فى إصابة النبات. تتأثر هاتين الحالتين وهما إنتقال جزيء T-DNA إلى خلايا النبات العائل وقدرة الطفيل أى البكتيريا على الإصابة virulence بجزء آخر من البلازميد فى مكان آخر منه ويسمى هذا الجزء من البلازميد بمنطقة قدرة البكتيريا على إصابة النبات أى virulence region وهى بعيدة عن منطقة T-DNA تتكون المنطقة الأخيرة من عديد من الجينات. توجد جينات أخرى على البلازميد تتحكم فى عمليات حيوية أخرى مثل التزاوج الجنسي بين البكتيريا ونقل بلازميد Ti من البكتيريا الممرضة إلى البكتيريا الغير ممرضة وأيضاً جين أو جينات أخرى تتحكم فى تخليق مركب opine فى خلايا النبات العائل بعد أن تنتقل هذه الجينات من البلازميد Ti إلى كروموسومات النبات العائل. وأيضاً جين أو جينات تتحكم فى عدم التوافق بين بعض البلازميدات وبعض سلالات من بكتيريا التدرن التاجى وأيضاً جين أو جينات أخرى تتحكم فى تحديد مكان أصل وبداية إنقسام ونسخ وتضاعف البلازميد replication, origin of transcription (شكل ١٢٩).



شكل ١٢٩: البلازميد Ti وموقع بعض الجينات التى تقوم بعمل بعض الوظائف الهامة.

يعتبر البلازميد Ti فعال في نقل DNA الخلية البكتيرية إلى المادة الوراثية في النبات ولكن له بعض العيوب حيث أن أستعماله في نقل مادة وراثية غريبة foreign أي غير موجودة به صعب حيث أن البلازميد كبير الحجم ومن الصعب التعامل معه وراثياً *manipulate genetically* والأهم من ذلك أن الخلية للنبات العائل تتحول من خلية عادية إلى خلية محولة تنقسم بسرعة كبيرة وتدخل في تكوين الأورام أو التدرنات ولذلك من الصعب إعادة تكون نبات عادى من هذه الخلايا المحولة *transformed*. أتضح أيضاً أن الجينات الموجودة في T-DNA عدا جينات الحواف (الحافة اليمنى والحافة اليسرى) ليس لها دور في نقل جزيء T-DNA من البكتيريا إلى خلايا النبات العائل أو التحامه بـكروموسوماته. ومما هو جدير بالذكر أن إدخال جينات أو أجزاء DNA من خلايا الحيوان أو البكتيريا أو النباتات الزهرية التي ليس لها علاقة بالنبات العائل إلى T-DNA البلازميد حيث توجد هذه الجينات في داخل T-DNA فإن هذه الجينات يمكن نقلها إلى المادة الوراثية في النبات العائل وتصبح جزء منها ولكنها تكون خاملة أي غير قادرة على التعبير عن وجودها في النبات العائل وإظهار صفاتها. ولكن في بعض الحالات وعند إضافة جين غريب ثم يضاف إليه الجزء المحفز أو المهيئ *promoter region* لجين إنزيم *opine synthetase* فإن هذا الجين يسمى جين كيميى *chimaeric gene* وبذلك يمكن لبعض الجينات المنقولة أن تصبح نشطة أي قادرة على إظهار صفاتها في خلايا النبات وذلك نتيجة لنشاط بعض الإنزيمات الخاصة بها.

يمكن إزالة الجزء الخاص بتكوين التدرن أو الورم من البلازميد وهو عبارة عن الجزء المحتوى على الجينات الخاصة بتخليث الأوكسينات والسييتوكينينات فقط من T-DNA دون إزالة الحافتين اليمنى واليسرى والذين تتحكمان في نقل T-DNA إلى خلايا العائل يسمى الجزء الخاص من البلازميد Ti الذى يتحكم في تكوين الورم *tumor inducing* باسم منطقة أو نكوجينك *oncogenic region*. وهى

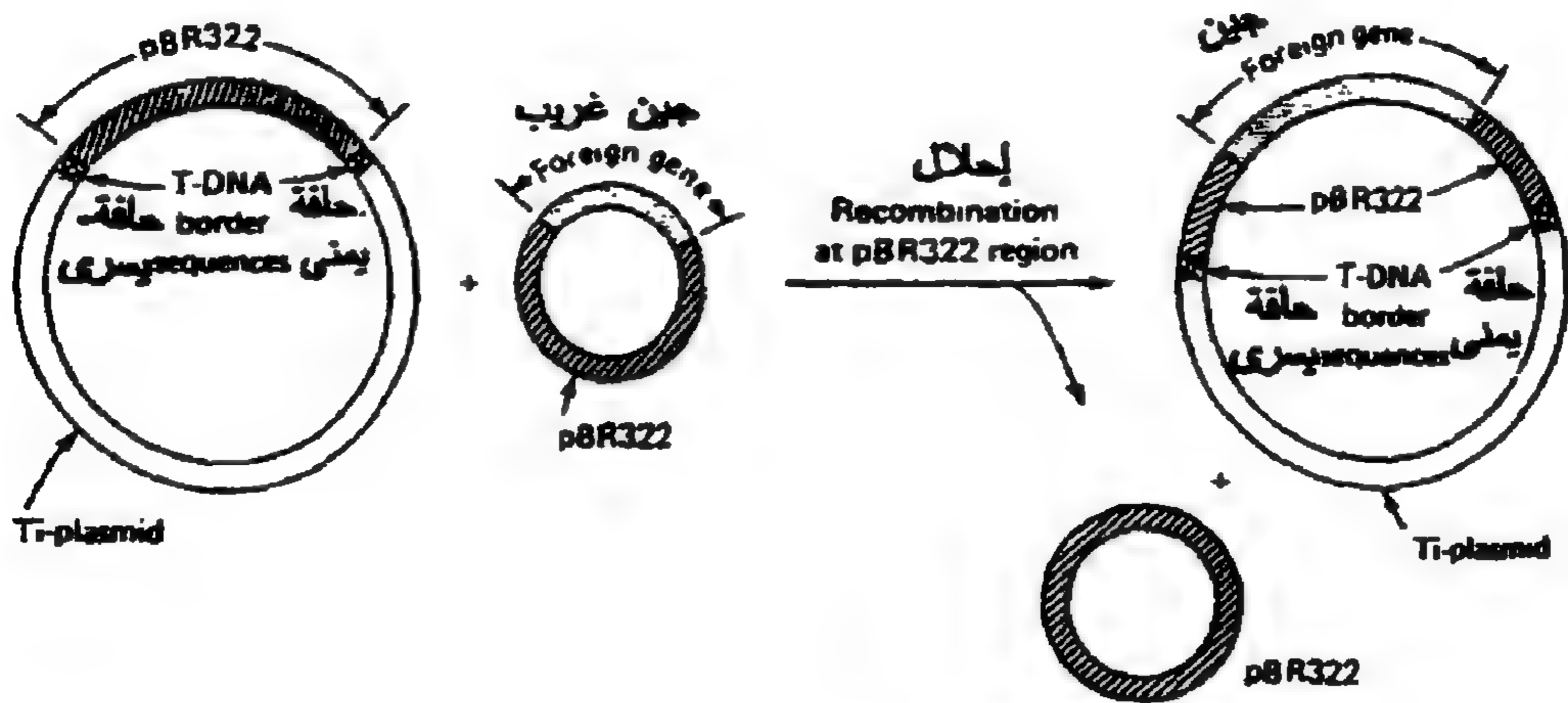
الجزء الذى يحتوى على جينات تخليق الأوكسينات والسيتوكينينات. يتم نقل هذا البلازميد إلى خلايا النبات العائل وتصبح خلايا النبات العائل المحتوية على هذا البلازميد فاقدة للقدرة على الهياج وأيضاً فاقدة القدرة على عدم التأثر بأوكسينات وسيتوكينينات خلايا النبات العائل أو بمعنى آخر فإن الخلايا المحولة تصبح محكومة وتحت تأثير أوكسينات وسيتوكينينات خلايا النبات العادية ولذلك فإن هذه الخلايا المحولة تكون فاقدة الإنقسام السريع وتكوين الورم أو التدرن بالرغم من إحتوائها على البلازميد. كما يمكن لهذه الخلايا المحولة والتي تحتوى على عوامل وراثية جديدة أن تنقسم إنقساماً عادياً وبسرعة عادية لتكوين نبات محول كامل جديد به عوامل وراثية جديدة.

أى أنه بذلك تصبح الخلايا المحولة خلايا عادية بها مادة وراثية أو عوامل وراثية جديدة وبالطبع تفقد هذه الخلايا المحولة قدرتها على الهياج. يمكن شغل الأماكن الخالية فى بلازميد Ti فى هذه الحالة وهى أماكن جينات الأوكسينات والسيتوكينينات فى جزيء T-DNA بواسطة جينات كيميائية خاصة بمقاومة بعض المضادات الحيوية شديدة السمية مثل كاناميسين kanamycin وميثوتريكسيت methotrexate. يمكن وضع هذين المضادين الحيويين فى البيئة وبذلك تصبح بيئة إنتخابية حيث ينمو عليها فقط الخلايا المحولة والتي تحتوى على جينات المقاومة لهذين المضادين الحيويين وأيضاً تنمو عليها النباتات المحولة فقط والتي لها صفة المقاومة لهذين المضادين الحيويين. وبذلك يسهل عزل الخلايا المحولة من الخلايا الأخرى حيث أن الخلايا المحولة تعيش والخلايا العادية تموت.

يعتبر كبر حجم بلازميد Ti غير مرغوب حيث يصعب نقله والعمل به والتعامل معه. يمكن التغلب على هذه الصعوبة وذلك بإزالة الجزء الأساسى فى T-DNA مع ترك الحافتين (الحافة اليمنى والحافة اليسرى) أى إزالة الجزء المحتوى على جينات تخليق الأوكسينات والسيتوكينينات. يتم شغل هذا المكان الفارغ من



البلازميد بواسطة بلازميد آخر صغير ومدرّوس وراثياً تماماً أى معروف فيه تتابع الجينات المختلفة وهذا البلازميد يكون أحد بلازميدات البكتيريا *E. coli* ومثال البلازميد pBR322. يتم أيضاً وضع الجين المطلوب فى بلازميد آخر من نفس النوع أى pBR322 أى عمل cloning للجين فى البلازميد. يسمح للبكتيريا *A. tumefaciens* بأخذ هذين النوعين من البلازميد وهو النوع الحامل للجين المطلوب إدخاله فى المادة الوراثية والنوع الآخر هو الغير حامل للجين أى بلازميد Ti. يحدث homologous recombination بين البلازميدات pBR322 فى بعض خلايا البكتيريا وتكون النتيجة نقل الجين المطلوب فى الجزء المخصص له cointegration فى جزء T-DNA أى بين الحافتين وبين جزيئين من بلازميد *E. coli* وهو pBR322 وذلك لبلازميد الخلية البكتيرية المسببة لمرض التدرج التاجى أى بلازميد Ti (شكل ١٣٠).



شكل ١٣٠: نقل جين غريب إلى البلازميد Ti باستخدام بلازميد آخر صغير.

عند إضافة الخلية البكتيرية للنبات فإنها تنقل إلى كروموسومات خلية النبات جميع أجزاء DNA الموجود بين حافتين جزء T-DNA أى أنها تنقل إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل بلازميد *E. coli* أى pBR322 بما يحمله من الجين

المطلوب نقله. ولقد أستعملت هذه البلازميدات بنجاح وبكفاءة عالية فى نقل الجينات المطلوبة إلى كروموسومات خلية أو خلايا النبات العائل ثم ينتج من هذه الخلايا نبات كامل خصب عادى يحتوى على الجينات المنقولة وتصبح هذه الجينات كجزء عادى من كروموسوم النبات. وتنتقل أيضاً إلى نسل هذا النبات عن طريق حبوب اللقاح وخلية البيضة وبالطبع يسبق تكوين هذه الأجزاء الأنقسام الأختزالى والذى ينقسم فيه الجين المنقول بطريقة عادية كما فى جينات النبات الأخرى.

توجد طريقة أخرى تستعمل للتغلب على كبر حجم البلازميد Ti وهى نقل أى جين مطلوب أو جينات مطلوبة بين حافتي جزء T-DNA ثم نقل هذا الجزء وهو الحافتين والجين أو الجينات المطلوب نقلها إلى بلازميد صغير وبذلك يصبح هذا البلازميد الصغير محتوى على الحافتين لجزء T-DNA والجين أو الجينات المطلوب نقلها. يتم نقل المنطقة أو الجزء من البلازميد الخاص بقدرة الطفيل على إصابة النبات virulence region من هذا البلازميد إلى بلازميدات أخرى صغيرة. كلا من هذين النوعين من البلازميدات الصغيرة غير قادر على إصابة النبات على إنفراد. وعند السماح بخلط هذين النوعين من البلازميدات بالبكتيريا المسببة لمرض التدرن التاجى فإنها تنتقل إلى داخلها وتصبح خلايا هذه البكتيريا قادرة على إصابة النبات لأحتوائها على جين أو جينات الإصابة كما أن حافتي جزء T-DNA والجين أو الجينات المطلوبة تنتقل إلى كروموسومات خلية النبات العائل وتصبح جزء منها. وبذلك يتم نقل الجين أو الجينات إلى النبات العائل بكفاءة عالية.

تزداد الآن المعلومات الخاصة باستعمال بلازميد Ti فى نقل الجينات أى استعماله cloning vehicle أو vector وكلها فى صالح هذا البلازميد حيث أن يحدث تقدم ملحوظ فى استعماله مع وجود طرق جديدة باستمرار لتسهيل استعماله وزيادة كفاءة استعماله فى حالات متعددة لم يكن يستعمل فيها أصلاً.

ولذلك فإن نقل جينات من البكتيريا أو النبات أو الحيوان إلى خلايا النبات أصبح في الأمكان وأمكن أتجاره. ولكن مدى وكيفية تعبير هذه الجينات عن وظائفها في خلايا النبات العائل الجديد regulatory controls of expression of genes غير معروفة أو معروف عنها القليل. تصيب بكتيريا التدرن التاجي النباتات ذات الفلقتين فقط ولا تصيب النباتات ذوات الفلقة الواحدة وبالرغم من أن كثير من محاصيل الغذاء مثل القمح والذرة والأرز وقصب السكر تتبع نباتات ذوات الفلقة الواحدة. وأيضاً نفس الشئ بالنسبة للبلازميدات Ti. ولكن أمكن الآن تلقيح بروتوبلاست خلايا نباتات ذوات فلقتين مباشرة ببلازميد Ti أو بروتوبلاست خلايا بكتيرية ويسمى هذا البروتوبلاست الأخير sphaeroplasts ويمكن إنتاج نباتات كاملة بعد ذلك من هذه البروتوبلاست. وأمكن الآن أيضاً تلقيح بروتوبلاست خلايا نباتات ذوات الفلقة بواسطة بلازميد Ti ولكن حتى الآن يصعب أو يستحيل إنتاج نباتات ذوات فلقة كاملة من البروتوبلاست وذلك على عكس من ذوات الفلقتين.

زيادة الدراسات والمعلومات عن بلازميد Ti لا تزيد فقط من معلوماتنا عن طبيعة الطفيل المرضية أى طبيعية بكتيريا التدرن التاجي بل أيضاً تزيد من كفاءة نقل جينات مقاومة لأمراض النبات من نبات إلى آخر ويمكن أن يكون هذا النبات الأخير من جنس مختلف أو حتى من عائلة مختلفة. ومن مميزات هذه الطريقة أنها تنقل الجين المطلوب إلى خلية النبات العائل دون زيادة في جينات غير مرغوبة ودون حدوث نقص في جينات مرغوبة ومن مميزات أيضاً أنها سريعة ولا تحتاج إلى وقت لعمل التهجين بين النباتات crosses وأيضاً لعمل التهجينات الرجعية backcrosses. تعتبر العقبة الرئيسية في استعمال بلازميد Ti في مقاومة أمراض النبات هي نقص المعلومات عن مكان وجود جينات المقاومة في النبات في جينومات النباتات المختلفة وأيضاً كيفية تعبير هذه الجينات عن وظائفها في النباتات الجديدة المنقولة إليها.



٥ - بلازميد pIAA للبكتيريا *Pseudomonas*

الأوكسينات والبكتيريا *Pseudomonas savastanoi* ومرض تعقد الزيتون. تصيب هذه البكتيريا نبات الزيتون والدفلة *Nerium oleander* وتسبب حدوث أورام على الجذور والسيقان والفروع والأوراق وأعناق الثمار مسببة مرض تعقد الزيتون Olive knot تبدأ الأورام صغيرة ثم تكبر تدريجياً وقد تصل الأورام أحجام كبيرة قطرها عشرة سم أو يزيد. كما أن الأفرع الطرفية في النبات تتقزم أو تموت. وقد تسبب الإصابة الشديدة موت الأشجار. تعيش هذه البكتيريا في داخل هذه الأورام. وبدراسات البيولوجيا الجزيئية molecular biology والهندسة الوراثية لهذه البكتيريا أتضح أن البكتيريا المسببة لتعقد الدفلة تختلف عن البكتيريا المسببة لتعقد الزيتون في موقع الجينات اللازمة لتخليق إندول حامض الخليك حيث وجد في الحالة الأولى جينات مسؤولة عن تخليق IAA على البلازميد وهي الجينات *iaaM* وهي مسؤولة عن تخليق إنزيم تربتوفان *mono oxygenase* والذي يقوم بتحويل الحامض الأميني تربتوفان داخل البكتيريا إلى indoleacetamide وأيضاً الجينات *iaaH* المسؤولة عن تخليق إنزيم indoleacetamide hydrolase وهذا الإنزيم يقوم بتحويل indoleacetamide إلى إندول حامض الخليك كما يوجد أيضاً *iaaL* وهي جينات مسؤولة عن تخليق إنزيم IAA lysine synthetase وهو يسبب ارتباط IAA مع الحامض الأميني ليسين ليصبح IAA المرتبط أي IAA lysine. تحدث جميع الخطوات السابقة داخل خلية البكتيريا. ينتشر IAA lysine من داخل خلية البكتيريا إلى خلية النبات وحيث تفرز خلية النبات إنزيم IAA lysine hydrolase وحيث يسبب ذلك فصل الأخير إلى IAA والحامض الأميني ليسين، يصبح إندول حامض الخليك حر وفعال حيث أنه في الصورة المرتبطة يكون غير فعال. يسبب إندول حامض الخليك تنسيط وتشجيع خلية وخلايا النبات على الانقسام السريع ولذلك يتكون الورم. وجد نفس الشيء في بكتيريا تعقد الزيتون إلا أن هذه الجينات لا توجد على البلازميد كما في

الدقة (شكل ١٣١) بل توجد على الكروموسوم البكتيري أى الخاص بالخلية البكتيرية. أى أن فى البكتيريا التى تصيب الدقة توجد هذه الجينات على البلازميد أما البكتيريا التى تصيب الزيتون توجد هذه الجينات على الكروموسوم البكتيري. يسمى هذا البلازميد الموجود فى داخل خلية البكتيريا بأسم بلازميد إندول حامض الخليك pIAA (شكل ١٣١).

أمكن تثبيط جينات *iaa L* على البلازميد فى خلايا بكتيريا الدقة ولم تتمكن خلايا البكتيريا فى هذه الحالة من تكوين الأورام على نبات الدقة، أى أن تكوين الأورام على النبات مرتبط بنشاط وفعالية وكفاءة جينات *iaa L* الموجودة على بلازميد الخلية البكتيرية.

أمكن إدخال جينات *iaa H* و *iaa M* من هذه البكتيريا إلى نوع آخر من البكتيريا لايحدث أورام على النبات وهى *Erwinia herbicola pv gypsophila* وأصبحت البكتيريا الأخيرة قادرة على عمل أورام على النبات *oncogenic activity*.

تعتبر جينات *iaa H* و *iaa M* عبارة عن *IAA operon* توجد هذه الجينات نفسها على البلازميد *Ti* أى *Ti plasmid* فى البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجى. يثبت ذلك أن هذين النوعين من البكتيريا *P. savastanoi* و *A. tumefaciens* لهما أصل مشترك واحد أى أنهما نسل وأحفاد لأصل واحد وجد منذ أزمنة أو عصور أو أحقاب جيولوجية أو منذ زمن بعيد.

حالة الجينات المسنولة عن تكوين السيتوكينينات فى بكتيريا *P. savastanoi* غير واضحة وغير معروفة بالتفصيل كما فى حالة بكتيريا التدرن التاجى وكما سبق شرحه.

بالرغم من أن هذين المرضين مرض التدرن التاجى ومرض تعقد الزيتون

ينشأ، عن جنسين مختلفين من البكتيريا وهما *Agrobacterium* و *Pseudomonas* إلا أن الهندسة الوراثية قد أثبتت عن طريق فسيولوجيا النبات أن هذين الجنسيتين قد كانا منذ أجيال جيولوجية سحيقة جنس واحد وأنهما من أصل واحد أى جد سحيق واحد لهذين الجنسيتين ثم تميزا بعد ذلك بمرور العصور والأزمنة والأحقاب الجيولوجية إلى جنسين مختلفين حاليين.

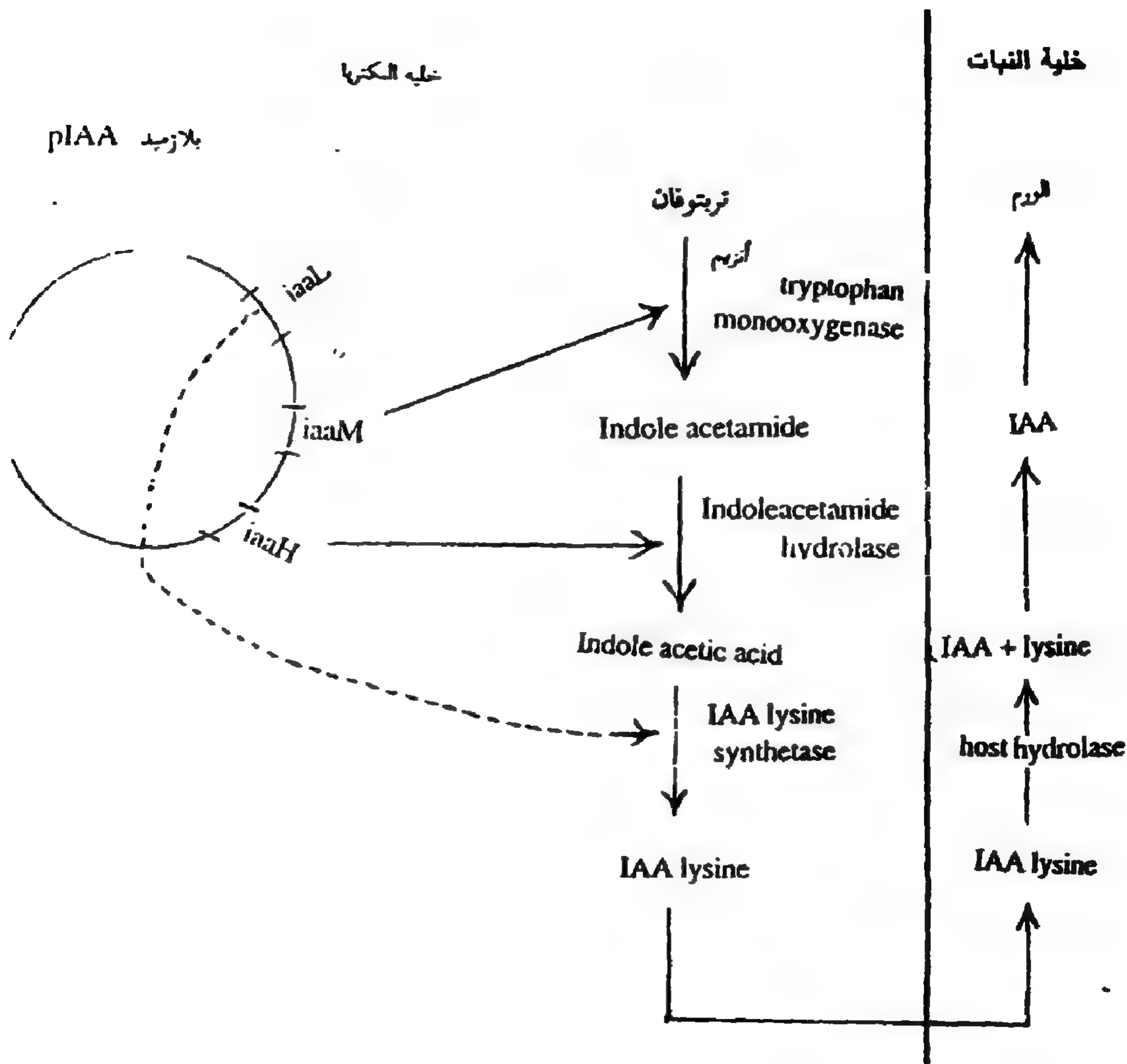
#### ٦ - البلازميدات ذات المدى العوائلى الواسع Broad host range plasmids :

أغلب البلازميدات يمكن أن تبقى وتتواجد فى عدد محدود من البكتيريا المتقاربة فى تركيبها الوراثى، وهذه تسمى بلازميدات ذات مدى عوائلى ضيق narrow host range plasmids. البلازميدات R القابلة للإنتقال ذاتياً فى مجموعة عدم التوافق IncP للبكتيريا إ. كولاي وأيضاً المجموعة IncP1 للبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*، على أى حال، واضح أنها يمكن إنتقالها وبقائها فى عدد كبير من أنواع البكتيريا. وهذه تسمى بلازميدات ذات المدى العوائلى الواسع broad host range plasmids. غير معروف السبب فى أن بعض البلازميدات لها مدى عوائلى ضيق وأخرى لها مدى واسع. يمكن أستعمال البلازميدات ذات المدى العوائلى الواسع فى الدراسات الوراثية فى مدى واسع من أصناف وأنواع البكتيريا. ولأنها يمكنها الإلتحام (بتكرارية منخفضة) فى كروموسوم العائل لكثير من الأنواع، فإنها تقدم أداة هامة لعمل الخرائط الوراثية لكائنات أو أنواع أو أصناف أو أجناس لم يكن عمل خرائط وراثية لها سابقاً. بهذه الطريقة، الخرائط الوراثية تم الحصول عليها لكثير من البكتيريا الهامة الإقتصادية، وهذه الخرائط أو الأمكانيات لعمل هذه الخرائط سهلت بناء وتخليق وتركيب السلالات ذات الصفات المرغوبة.

كثير من هذه البلازميدات قادرة على تحريك الكروموسوم ولكن بنسبة أى تكرارية منخفضة جداً (حوالى  $10^{-1}$  لكل خلية). بواسطة طرق وراثية مختلفة



وطرق إعادة صياغة دنا مختلفة، على أي حال، فإن أنواع مختلفة من هذه البلازميدات تم بناؤها أي تركيبها معملياً لتساعد حركة الكروموسوم، وفيها حركة الكروموسوم تم تنشيطها بدرجة معينة أي بعامل factor (by factor) وهو ١٠<sup>٢</sup> إلى ١٠<sup>٥</sup>.



شكل ١٣١: خطوات تخليق إندول حامض الخليك في داخل البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* ودوره في تكوين الورم في النبات العائل.

## ٦ – البلازميدات الممرضة للإنسان والحيوان

## Animal and human infectious plasmids:

عديد من البلازميدات تجعل البكتيريا الغير ممرضة للإنسان أو الحيوان ممرضة؟ نفس الشئ بالنسبة للبكتيريا الخالية من البلازميدات. تخلق البلازميدات المسماة البلازميدات Ent الخاصة بالبكتيريا إ. كولاى سموم داخلية enterotoxins وهى المسؤولة عن إسهال معين يسمى الإسهال المتحرك أو إسهال المسافرين traveler's diarrhea. البلازميد المعروف بإسم Hly (for hemolysis) يوجد فى سلالات البكتيريا إ. كولاى. الموجودة فى الخزائر وهو بلازميد مسئول عن تحليل الدم. بالرغم من أن الهيموليسين hemolysin يفسد ويحطم كرات الدم الحمراء فى عينات الدم فإن البلازميد Hly يسبب أى إصابة أو مرض. بعض البلازميدات الموجودة فى البكتيريا الممرضة للإنسان المسماة *S. aureus* تسبب زيادة وتشجيع الإصابة بالبكتيريا. إنزيم البنيسلينييز penicillinase والذى يسبب تحطيم وتحليل حزيء البنسلين وفساده والناتج عن جين أو جينات موجودة على بلازميد موجود داخل الخلية البكتيرية *S. aureus* قد تم دراسته بالتفصيل.

## ٨ – بلازميدات أخرى Other plasmids:

عديد من أنواع البكتيريا *Pseudomonas* يمكن أن تستعمل مئات عديدة من المركبات العضوية كمصدر للكربون وخاصة المركبات العضوية السامة مثل الكامفور camphor والتلوين والأوكتين octane. هذه القدرة على التحول الغذائى موجودة فى مجموعة من البلازميدات وهذه المجموعة معروفة بإسم البلازميدات المحللة degradation plasmids. كل بلازميد قادر على عمل طريقة أو أكثر للتحول الغذائى لهذه المركبات وذلك لتحليل هذه المركبات. ولأن هذه العمليات تحتاج إلى إنزيمات كثيرة فإن البلازميدات تكون كبيرة بدرجة كافية. هذه البلازميدات تمكن البكتيريا من تحطيم كثير من المركبات التركيبية وهكذا تصبح

أداة هامة في إزالة ملوثات البيئة الناتجة عن أنشطة الإنسان. مثال ذلك، بعض السلالات يمكنها تحطيم المركبات الإيدروكربونية الكلورية الثابتة جداً ومبيدات الحشائش وعديد من المنظفات detergents. كثير من المعامل تحاول إستعمال الهندسة الوراثية لتركيب بلازميدات راقية أو مميزة أو متطورة أو رفيعة المستوى والتركيب super plasmids والتي تستعمل في منع ومقاومة التلوث والتخليق الكيماوى.

بعض البلازميدات المعزولة والتي تسبب مقاومة العائل ضد الأيونات المعدنية السامة. بعض هذه البلازميدات موجودة في البينات المختلفة المحتوية على هذه الأيونات ومثال ذلك النفايات sludge المنتجة بواسطة إعادة التكوين والتحميض الصناعى للأفلام أى أفلام التصوير (المقاومة لأيون الفضة). تمت دراسة مستفيضة للكيمياء الحيوية الخاصة بمقاومة أيونات الزئبق  $Hg^{++}$ . وهى ناتجة من بلازميدات مشفرة لإنزيم الإختزال reductase والذي يحول الزئبق  $Hg^{++}$  إلى زئبق معدنى والذي يكون متطاير بدرجة كافية وبذلك يتطاير بسهولة بعيداً عن المكان.

### **ملخص عام عن البلازميدات**

### **Summary on Plasmids**

#### **بعض الخواص والملامح الرئيسية للبلازميدات**

#### **Basic features of plasmids**

البلازميدات تتكون من دنا حلقى وتوجد مستقلة بداخل الخلية البكتيرية تحمل البلازميدات جين أو أكثر. تكون هذه الجينات مسئولة عن بعض الصفات لخلية البكتيريا الحاوية لها ومنها أنها تعيش في تركيز مرتفع من المضادات الحيوية مثل الأمبسليلين والكلورامفينكول. فى تجارب مقاومة المضادات الحيوية فإنها



تستخدم كمعلم إنتخابى selectable marker وبها يمكن أثبات أن خلية البكتيريا تحتوى على بلازميد معين يحتوى البلازميد على الأقل تتابع واحد لدنا معين وهذا التتابع هو منطقة أصل تكرار أى تضاعف أى تكاثر البلازميد origin of replication ولذلك فإن هذه البلازميدات يمكن أن تتكاثر فى داخل الخلية البكتيرية مستقلة عن الكروموسوم البكتيرى. فى حالة البلازميدات الصغيرة تستخدم الإنزيمات اللازمة لتكرارها أى تضاعفها أى تكاثرها أى تكرار دنا replicative enzymes الخاصة بخلية البكتيريا أى تستخدم إنزيمات الخلية البكتيرية. ولكن فى حالة البلازميدات الكبيرة فإنها تحمل جينات خاصة بتخليق إنزيمات خاصة متخصصة فى تكرار أى تضاعف البلازميد. قليل من البلازميدات تكون قادرة على الإلتحام بالكروموسوم البكتيرى. هذه البلازميدات تعتبر مكملة للكروموسوم البكتيرى integrative plasmids يمكن أن تسمى episomes. يمكن أن يستمر الحال فى هذه الحالة لعدة أنسال وأجيال من البكتيريا ولكن بعد ذلك يمكن أن تصبح مستقلة على الكروموسوم مرة أخرى non-integrative plasmids ظاهرة التكامل مع الكروموسوم البكتيرى integration تحدث أيضاً فى حالة بعض الفاجات وسيتم شرحها فى باب تالى.

### حجم وعدد البلازميدات Size and copy number:

هاتين صفتين هامتين للبلازميدات التى تستخدم فى تجارب التوطين. تستخدم فى هذه العملية بلازميدات أقل من ١٠ كيلو قاعدة kb وتستخدم كناقل وسيط متحرك cloning vehicle. يتراوح حجم البلازميدات من ١ كيلو قاعدة للبلازميدات الصغيرة إلى أكثر من ٢٥٠ كيلو قاعدة للبلازميدات الكبيرة (جدول ٢١). ولهذا فإن قليل من البلازميدات يستخدم فى تجارب التوطين. ولكن فى بعض الحالات البلازميدات الكبيرة يمكن أقلمتها للتوطين فى وجود ظروف خاصة.

أما عن عدد البلازميدات داخل خلية البكتيريا الواحدة copy number فإنها

تختلف أما عن العوامل التي تتحكم في العدد غير معروفة بالتفصيل أو جيدا. يوجد في الخلية البكتيرية بلازميد واحد خاصة في حالة البلازميدات الكبيرة وأكثر من ذلك خاصة في حالة البلازميدات الصغيرة حيث قد يصل عددها ٥٠ أو أكثر. عامة يفضل في تجارب التوطين أن يوجد بداخل الخلية البكتيرية عدد كبير من البلازميدات المعاد صياغتها وهكذا يمكن الحصول على كميات كبيرة من البلازميدات المعاد صياغتها.

جدول ٢١: أحجام بعض البلازميدات.

الكائن (نوع البكتريا)	الحجم		البلازميد
	طول النيوكليوتيد (كيلو قاعدة)	الوزن الجزيئي MDa	
<i>E. coli</i>	٢,١	١,٨	pUC8
<i>E. coli</i>	٦,٤	٤,٢	ColE1
<i>Pseudomonas</i> and others	٥٤	٣٦	RP4
<i>E. coli</i>	٩٥	٦٣	F
<i>Pseudomonas putida</i>	١١٧	٧٨	ToL
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	٢١٣	١٤٢	pTi Ach5

### التزاوج والتوافق : Conjugation and compatibility

يوجد نوعين من البلازميدات متزاوجة conjugative وغير متزاوجة non-conjugative. البلازميدات المتزاوجة تتميز بقدرتها على تنشيط وحدوث التزاوج الجنسي بين خلايا البكتيريا وبالتالي وجود البلازميد في الخليتين المتزاوجتين نتيجة لتكاثره. وهكذا يمكن أن ينتشر البلازميد في خلايا المستعمرة البكتيرية. التزاوج وانتقال البلازميد من خلية أخرى يتحكم فيه مجموعة من الجينات تسمى مجموعة الانتقال set of transfer أو تسمى *tragenes* والتي توجد على البلازميد المتزاوجة وتكون غائبة في حالة البلازميدات الغير متزاوجة. ومما هو جدير

بالذكر أن بعض البلازميد غير المتزاوجة في بعض الظروف الخاصة تنتقل مع البلازميدات المتزاوجة *cotransferred along with a conjugative plasmid* عندما يوجدان في نفس خلية البكتيريا. كثير من أنواع البلازميدات توجد في داخل الخلية الواحدة، شاملة أكثر من نوع من البلازميدات المتزاوجة. في حالة البكتيريا إ. كولاى فإن من المعروف أن الخلية الواحدة تحتوى على عدد من البلازميدات المختلفة قد يصل إلى سبعة. ولكى يستمر وجود هذه البلازميدات المختلفة في الخلية البكتيرية يجب أن تكون متوافقة *compatible* في حالة وجود بلازميدين غير متوافقين في نفس الخلية فإن إحداهما يفقد من الخلية بسرعة. توجد أنواع عديدة من البلازميدات يمكن أن تصنف تبعاً لذلك في مجاميع عدم توافق مختلفة *incompatibility groups*. والبلازميدات في مجموعة عدم التوافق الواحدة تكون متقاربة ومتشابهة في كثير من الصفات *are often related to each other in various ways* أساسيات عدم التوافق غير معروفة بالتفصيل أو بدقة.

### **تصنيف البلازميدات : Plasmid classification**

تصنيف البلازميدات التى تتواجد طبيعياً *natural plasmids* يكون على أساس الصفات الرئيسية المشفرة والمحكومة بجينات البلازميد. وفيما يلى الخمسة أنواع الرئيسية تبعاً لهذا التقسيم:

#### **١ - بلازميدات الخصوبة أو بلازميدات F : Fertility or F plasmids**

لابد أن تحمل هذه البلازميدات مجموعة الجينات المسماه *tra* أى *tra genes*. أى يكون لها القدرة على تنشيط التزاوج بين خلايا البكتيريا وإنتقال البلازميدات ومثال ذلك البلازميد F في البكتيريا إ. كولاى.

#### **٢ - بلازميدات المقاومة أو بلازميدات R : Resistance or R plasmids**

تحمل جينات تضيفى وتكسب خلية البكتيريا مقاومة لمضاد حيوى واحد أو أكثر أو عامل أو أكثر مضاد للبكتيريا *antibacterial agent* مثل الكلورامفينيكول



والأمبسيلين والزئبق هذه البلازميدات هامة جداً في حالة علم الأحياء الدقيقة الإكلينيكي clinical microbiology لأنها تكسب البكتيريا الممرضة مقاومة للمضادات الحيوية وبذلك تشتد وطأة المرض أو الأمراض لفشل المضادات الحيوية في مقاومة البكتيريا مثل البلازميد RP4 والموجود عادة في *Pseudomonas* وبعض البكتيريا الأخرى.

### ٣ - بلازميدات Col plasmids colicins :

ينتج عنها بروتين أو بروتينات تسمى Col plasmids colicins وهي عبارة عن بروتينات يمكن أن تقتل بكتيريات أخرى ومثال ذلك البلازميد ColE1 للبكتيريا *E. coli*.

### ٤ - البلازميدات المحللة Degradative plasmids :

تمكن الخلايا البكتيرية من تحليل مركبات غير معتادة مثل التلوين وحامض السلسيك، ومثال ذلك البلازميد ToL الموجود في البكتيريا *Pseudomonas putide*.

### ٥ - البلازميدات الممرضة Virulence plasmids :

وهي تكسب الخلية البكتيرية القدرة على الإصابة مثل البلازميد Ti للبكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* والتي تسبب إصابة للنباتات مكونة مرض التدرن التاجي والذي يصيب النبات ذوات الفلقتين.

### وجود البلازميدات في كائنات أخرى خلاف البكتيريا

#### Presence of plasmids in organisms other than bacteria:

تكون البلازميدات منتشرة في البكتيريا ولكنها غير موجودة في الكائنات الأخرى إلا قليل منها. ففي بعض الكائنات حقيقية النواة مثل الفطريات الخيطية وأيضاً في فطر غير خيطي وهو الخميرة. ومن هذا القليل فطر خميرة الخباز *bake's yeast (Saccharomyces cerevisiae)* حيث يحتوى على بلازميد حلقي طوله ٢ ميكرومتر، يوجد هذا البلازميد في كثير من سلالات هذا الفطر. إكتشاف

هذا البلازميد في هذا الفطر من الأهمية بمكان لأنه أعطى الفرصة لتكوين ناقلات وسيطية متحركة vectors قادرة على توطين الجين بداخل هذا الفطر الهام جداً في الصناعة مثل الخبز والجعة. وفي حالة الفطريات الخيطية توجد قليل من الفطريات بها بلازميدات ومنها الفطر *Rhizoctonia solani* وهو فطر رمى كما أنه يسبب أمراض للنبات. أما عن الكائنات الحية الأخرى فلم يذكر وجود البلازميدات فيها حتى الآن.

### البلازميدات غير الحلقية Non circular plasmids:

في الكائنات بدائية النواة تكون البلازميدات حلقية ولكن توجد حالات قليلة يكون فيها البلازميد شريطي غير حلقى مثل *Streptomyces* وأيضاً *Streptococci* وبعض سلالات من *Nocardia opaca*. وغير معروف كيف أن دنا في هذه الحالة يبقى نفسه من فعل وتأثير إنزيمات exonucleases في حالات الفطريات الخيطية مثل الفطر *Rhizoctonia solani* يكون البلازميد شريطي أيضاً. في الفطر الأخير وجد أن السلالات التي تحتوى بلازميدات تكون ضعيفة النمو وضعيفة في قدرتها على إصابة النباتات مع حدوث تحلل وموت لخلايا الفطر ومع عدم تكوين أجسام حجرية ومع وجود تركيزات عالية من حامض الأوكساليك ونشاط منخفض لبعض الإنزيمات منها *adenylate cyclose* وأيضاً *phosphodiesterase* وأيضاً تركيز منخفض من *cAMP*. والعكس صحيح في السلالات الخالية من البلازميدات. توجد أيضاً بلازميدات شريطية في الفطر *Ceratocystis ulmi* وأحجامها تتراوح بين ٢٢ كيلو قاعدة وأقل من ذلك وقد تصل ٨ أو أقل والسلالات الممرضة للنبات تحتوى بلازميدات. والسلالات الغير ممرضة للنبات لا تحتوى بلازميدات أى أن الحالة عكس الفطر السابق. كما أن السلالات التي تحتوى بلازميدات تفرز كميات كبيرة من مركب *ceratoulmin* والعكس صحيح في السلالات الغير ممرضة. وجد أن الفطر *Gaeumanomyces graminis* تحتوى هيفاته على بلازميدات شريطية وهو يسبب مرض take-all في القمح.

# المراجع





## المراجع

### أولاً - المراجع العربية:

- ١ - عماد، فسيولوجيا النبات، ١٩٩٨، المكتبة الأكاديمية، القاهرة. (منفرداً).
- ٢ - منظمات النمو والإزهار، ١٩٩٥، المكتبة الأكاديمية، القاهرة. (منفرداً).
- ٣ - أساسيات أمراض النبات والتقنية الحيوية، ١٩٩٣، المكتبة الأكاديمية، القاهرة. (منفرداً).
- ٤ - أبصال الزينة وأمراضها وآفات وطرق المقاومة، ١٩٨٩، منشأة المعارف بالأسكندرية بالإشتراك مع الدكتور / محمود خطاب (طبعة ثانية ٢٠٠٢).
- ٥ - زهور القطف وأمراضها وآفات وطرق المقاومة، ١٩٨٩، منشأة المعارف بالأسكندرية بالإشتراك مع الدكتور / محمود خطاب.
- ٦ - مورفولوجيا وتشرح النبات، طبقات كثيرة من ١٩٦٩ حتى ١٩٩٠، دار المعارف الحديثة بالإشتراك مع الدكتور / حسين العروسى.
- ٧ - الممكنة النباتية، طبقات كثيرة من ١٩٧٠ حتى الآن، دار المعارف الحديثة، بالإشتراك مع الدكتور / حسين العروسى.
- ٨ - الأطلس النباتى، ١٩٩٠، دار المعارف الحديثة بالإشتراك مع الدكتور / حسين العروسى والدكتور / سمير ميخائيل.
- ٩ - فسيولوجيا النبات التجارب العملية، ١٩٧٩، دار المطبوعات الجديدة بالإشتراك مع الدكتور / جمال حسونة والدكتور / مجدى مذكور.
- ١٠ - طرق ومناهج البحث العلمى، ٢٠٠٣، منشأة المعارف بالأسكندرية. (منفرداً).

ثانياً – المراجع الأجنبية :

- Agriso, G. N. 1997. Plant Pathology. Academic Press, U.S.A.
- Alcamo, E. D. 2001. Encounters In Microbiology. Jones and Bartlett Publishers. Boston, U.S.A.
- Alcamo, E. D. 2001. Laboratory Fundamentals of Microbiology. Jones and Bartlett Publishers, U.S.A.
- Anonymous. 2001. The Ribosome. Cold Spring Harbor Laboratory Press-A Symposium.
- Banwart, G. J. 1989. Basic Food Microbiology. Chapman and Hall, Inc., New York, U.S.A.
- Berne, R. M.; Levy, M. W. 1990. Principles of Physiology. The C. V. Mosby Company. St. Louis, U.S.A.
- Bernstein, R.; Bernstein, S. 1996. Biology. WCB. WM. C. Brown Publishers, U.S.A.
- Berzins, A. 1998. Basic Cloning Procedures. Springer Verlag, Germany.
- Bettelheim, F. A.; March, J. 1998. Introduction to Organic and Biochemistry. Harcourt Brace College Publishers, U.S.A.
- Blackstock, J. C. Biochemistry. 1998. Butterworth Heineman, Oxford, U. K.
- Borem, A.; Santos, F. R. and Bowen, D. E. 2003. Understanding biotechnology, Prentice Hall.
- Boyer, R. 1999. Concepts in Biochemistry Brooks/Cole Publishing Company.
- Burton, G. R. W.; Engelkirk, P. G. 2000. Microbiology for the Health Sciences. Lippincot Williams, and Wilkins, Philadelphia, U.S.A.



- Cappuccino, J. C.; Sherman, N. 2001. Microbiology, Benjamin Cummings, San Francisco, U.S.A.**
- Carroll, S. B.; Grenier, J. K. and Weatherbee, S. D. 2005. From DNA to diversity-molecular genetics and the evolution of animal design. Blackwell Publishing.**
- Champe, P. C.; Harvey, R. A. 2000. Biochemistry. Lippincott-Raven Publishers, U.S.A.**
- Collado-Vides, J. and Hofestadt, R. 2002. Gene regulation and metabolism. The Bradford Book-The MIT Press.**
- Concepts Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A.**
- Copper, H. D.; Spillane, C.; Hodgkin, T. 2001. Broadening the Genetic Base of Crop Production. GABI Publishing, U.K.**
- Cowell, J. K. 2001. Molecular Genetics of Cancer. Bios Scientific Publishers, U.K.**
- Davies, D. S. 2001. Genetic Dilemmas. Routledge, New York, U.S.A.**
- Davis, D. S. 2001. Genetic Dilemmas. Routledge, Taylor & Francis Group.**
- Dennis, C.; Gallagher, R. 2001. The Human Genome, Nature Palgrave, U.S.A.**
- Dickinson, I. M. 2003. Molecular Plant Pathology. Taylor & Francis Group.**
- Dominiczak, A. F.; Connell, J. M.; Soubrier, F. 1999. Molecular Genetics of Hypertension, Bios Scientific Publisher, U. K.**
- Edwards, A. W. 2000. Foundations of Mathematical Genetics Cambridge University Press, U. K.**
- Elliott, W. H.; Elliott, D. C. 2001. Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, Oxford, U.K.**

- Enger, E. D.; Ross, F. C. 2000. Concepts in Biology, McGraw-Hill, U.S.A.**
- Evett, L. W.; Weir, B. S. 1998. Interpreting DNA Evidence, Sinauer Associates, Inc/ Publishers, Sunderland Massachusetts, U.S.A.**
- Gjerde, D. T.; Hanna, C. P. and Hornby, D. 2002. DNA Chromatography. Wiley-VCH.**
- Gladwin, M.; Trattler, B. 2000. Clinical Microbiology McGraw-Hill, U.S.A.**
- Glich, B. R. and Pasternak, J. J. 2005. Molecular Biotechnology-Principles and applications of recombinant DNA. ASM Press.**
- Goldberg, S. 1999. Clinical Biochemistry, McGraw-Hill, U.S.A.**
- Gould, J. L.; Keeton, W. T. 1996. Biological Science, W. W. Norton & Company, New York, U.S.A.**
- Graham, G. 2002. Gene-A Philosophical Inquiry. Routledge, Taylor & Francis Group.**
- Graur, D.; Li, W. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.**
- Griffiths, A. F.; Miller, J. H.; Gelbart, W. M. 2000. An Introduction to Genetic Analysis, W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A.**
- Hamelton, D. 1996. Narrow Roads of Gene Land, W. H. Freeman, U.S.A.**
- Hammond, S. M.; Lambert, P. A. 1978. Antibiotics and Antimicrobial Action. Wdward Arnold, London, U.K.**
- Harold, F. M. 2001. The Way the Cell. Oxford University Press, U.K.**

- Hendrick, P. W. 2000. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers, Boston, U.S.A.
- Heritage, J.; Evans, E. G.; Killington, R. A. 1996. Introductory Microbiology, Cambridge University Press, U.K.
- Herren, R. V. 2005. Introduction to Biotechnology-An Agricultural Revolution. Thomson Delmar Learning.
- Hey, J. 2001. Genes, Categories and Species. Oxford University Press, U.K.
- Hey, J. 2001. Genes, Categories and Species. Oxford University Press.
- Hope, I. A. 1999. Elegans. Oxford University, Press, U.K.
- Horwitz, M. 2000. Basic Concepts in Medical Genetics. McGraw-Hill, U.S.A.
- Isenberg, G. 1995. Cytoskeleton Proteins, Springer Verlag, Germany.
- Jain, H. K. 1999. Genetics Concepts and Implications, Science Publisher, Inc., Enfield (U.S.A.).
- Jamarin, J. 2001. Principles of Genetics, McGraw-Hill, New York, U.S.A.
- Jordan, B. 2001. DNA Microarrays: Gene Expression Applications. Springer Verlag, Germany.
- Kereuzer, H.; Massey, A. Recombination DNA and Biotechnology, ASM Press, Washington, D. C., U.S.A.
- Kieleczawa, J. 2005. DNA Sequencing-Optimizing the Process and Analysis. Jones and Bartlett Publishers.
- Klug, W. S.; Cummings, M. R. 1996. Essentials of Genetics. Prentice-Hall, Inc. U.S.A.



- Kontermann, R.; Dubel, S. 2001. Antibody Engineering. Springer Verlag, Berlin, Germany.**
- Kreuzer, H. and Massey, A. 2005. Biology and Biotechnology- Science, Applications and Issues. ASM Press.**
- Latchman, D. S. 2005. Gene Regulation. Taylor & Francis Group.**
- Lesk, A. M. 2001. Introduction to Protein architecture. Oxford University Press.**
- Lewin, R. 1997. Patterns in Evolution. Scientific American Library, New York, U.S.A.**
- Lewis, R. 1997. Human Genetics, WCB, Brown Publishers, U.S.A.**
- Lewis, R. 2001. Human Genetics, McGraw-Hill, New York, U.S.A.**
- Lewis, R. 2003. Human Genetics-Concepts and Applications. McGraw-Hill.**
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. 2000. Molecular Cell Biology, W. H. Freeman and Company, U.S.A.**
- Long, C. 1999. Genetic Testing and use of Information. The AEI Press, Washington. D. C., U.S.A.**
- Lowrie P.; Wells, S. 2000. Microbiology and Biotechnology, Cambridge University Press, U.K.**
- Macdonald, F.; Ford, C. H. J. and Gasson, A. G. 2004. Molecular Biology of Cancer. Taylor & Francis Group.**
- Malcolm, S.; Goodship, J. 2001. Genotype to Phenotype, Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, U.K.**

- Maloy, S. R.; Cronan, J. E. Freifelder, D. 1994. Microbial Genetics, Jones and Bartlett Publishers, Boston, U.S.A.**
- McConkey, E. H. 2004. How the Human Genome works. Jones and Bartlett Publishers.**
- McGleenan, T.; Wiessing, U.; Ewald, F. 1991. Genetics and Insurance. BIOS Scientific Publisher Limited, U.K.**
- Mckane, L.; Kandel, J. 2001. Microbiology, Essentials and Applications. McGraw-Hill, U.S.A.**
- Melkin, D.; Lindee, M. 1995. The DNA Mystique. W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A.**
- Midgley, G.; Clayton, Y. M.; Hay, R. J. 1997. Diagnosis in Color Medical Mycology, Mosby-Wolfe, Chicago, U.S.A.**
- Morello, J. A.; Mizer, H. E.; Wilson, M. F. 1998. Microbiology, McGraw-Hill, U.S.A.**
- Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. 2000. Harper's Biochemistry, McGraw-Hill, U.S.A.**
- Nicholl, D. T. 1996. An Introduction to Genetic Engineering, Cambridge Univ. Press, U.K.**
- Nuber, U. A. 2005. DNA Microarrays. Taylor & Francis Group.**
- Onions, A. H. S.; Smith, D. 1983. Preservation and Maintenance of Living Fungi, C.A.B, Slough, England.**
- Parker, S. P. 1986. McGraw-Hill Dictionary of Biology, McGraw-Hill, U.S.A.**
- Passarge, E. 2001. Color Atlas of Genetics. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.**
- Patrick, G. L. 2001. An Introduction to Medicinal Chemistry. Oxford, U.K.**

- Plomin, R.; DeFries, J. C.; McClearn, G. E.; Rutter, M. 1997. Behavioral Genetics. W.H. Freeman, New York, U.S.A.**
- Poole, R. K. 1998. Advances in Microbial Physiology, Academic Press, San Diego, U.S.A.**
- Rabilloud, T. 2000. Proteome Research-Two Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. Springer Verlag, Germany.**
- Ratledge, C.; Kristiansen, B. 2001. Basic Biotechnology, Cambridge Univ. Press. U.K.**
- Raven, P. H.; Johnson, G. B. 2002. Biology, McGraw-Hill, New York, U.S.A.**
- Razdan. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. Science Publishers, Inc.**
- Ring, C. A.; Blair, E. D. 2001. Genetically Engineered Viruses BIOS Scientific Publisher Limited, U.K.**
- Roshoski, R. 1996. Biochemistry, W. B. Saunders Company Philadelphia, U.S.A.**
- Russo, E.; Cove, D. 1995. Genetic Engineering, W. H. Freeman, U.S.A.**
- Saccone, C. and Pesole, G. 2003. Handbook of Comparative Genomics-Principles and Methodology. John Wiley.**
- Sapienza, A. M. and Stork, D. 2001. Leading Biotechnology Alliances. Wiley-Liss.**
- Sermonti, G. 1969. Genetics of Antibiotic Producing Microorganisms, Wiley-Interscience, U.S.A.**
- Shanson, D. C. 1999. Microbiology in Clinical Practice. Butterworth Heinemann, Oxford, U.K.**



- Sleifh, J. D.; Timbury, M. C. 1998. Notes on Medical Bacteriology, Churchill Livingstone, New York, U.S.A.
- Snustad, D. P.; Simmons, M. J. 2000. Principles of Genetics. John Wiley and Sons, Inc., U.S.A.
- Spencer, C. A. 2006. Genes, Aging and Immortality. Pearson-Prentice Hall.
- Stearns, S. C.; Hoekstra, R. F. 2002. Evolution an Introduction. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Stokes, E. J.; Ridgway, G. L.; Wren, M. W. 1993. Clinical Microbiology. Edward Arnold, London, U.K.
- Sussman, M. 1960. Growth and Development. Prentice-Hall, Inc., New Jersy, U.S.A.
- Sutton, J. 1998. Biology, McMillan Press, U.K.
- Swanson, C. R. 1960. The Cell. Prentice-Hall, Inc., New Jersy. U.S.A.
- Talaro, K. P.; Talaro, A. 2002. Foundations in Microbiology, McGraw-Hill, U.S.A.
- Teebi, A; Farag, T. 1997. Genetic Disorders Among Arab Populations, Oxford Univ. Press, U.K.
- Thieman, W. J. and Palladino, M. A. 2004. Introduction to biotechnology. Pearson Benjamin Cummings.
- Thomson, A. J. and Mc Whir, J. 2004. Gene Targeting and Embryonic stem Cell. Taylor & Franics Group.
- Ting, I. P. 1982. Plant Physiology. Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, U.S.A.
- Tourte, Y. 2004. Genetic Engineering and Biotechnology- Concepts, Methods and Agronomic Applications. Science Publishers, Inc.



- Twyman, R. M. 2004. Gene Transfer to animal Cells. Taylor & Francis Group.**
- Voet, D.; Voet, J.; Pratt, C. V. 1999. Fundamentals of Biochemistry. John Wiley and Sons, Inc., U.S.A.**
- Watson, J. D. 2000. A Passion for DNA, Oxford University Press, U.K.**
- Watson, J. D., 2001. Genes, Girls and Gamow, Oxford University Press, U.K.**
- Weaver, R. F.; Hendrick, P. V. 2000. Basic Genetics. WCB-Brown Publisher.**
- Whitford, D. 2005. Proteins Structure and Function. John Wiley.**
- Wilkins, M. B. 1989. Advanced Plant Physiology, Longman, Essex, U.K.**
- Wilson, G. N. 2000. Clinical Genetics, John Wiley and Sons, Inc., New York, U.S.A.**
- Wilson, K.; Walker, J. 2000. Practical Biochemistry: Principles and Techniques. Cambridge University Press, U.K.**
- Young, A. G.; Clarke, G. M. 2000. Genetics, Demography and Viability of Fragmented Population, Cambridge University Press, U.K.**
- Zubay, G. L. Biochemistry. 1998. WCB-Wm. C. Brown Publishers.**
- Zubay, G. L.; Parson, W. W.; Vance, D. E. 1995. Principles of Biochemistry, Wm. C. Brown Publishers, U.S.A.**
- Zweiger, G. 2001. Transducing the Genome. McGraw-Hill, U.S.A.**







Bibliotheca Alexandrina



0656012